



ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΘΡΟΜΒΩΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

" Είδη θρομβοφιλίας και Εργαστηριακή Διερεύνηση αυτών"

υπό

Θωμά Ν. Δημητρίου

Ειδικευμένου Αιματολογίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Θρόμβωση και Αντιθρομβωτική Αγωγή»

Λάρισα, 2021

Επιβλέπων:

Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας – κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Αλέξανδρος Τσελέπης, Καθηγητής Βιοχημείας – κλινικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων- (Επιβλέπων)
2. Σταυρούλα Τσιάρα, Αν. Καθηγήτρια Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Μιλτιάδης Ματσάγκας, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Αναπληρωματικό μέλος:

Νικόλαος Ρούσας, Αγγειοχειρουργός, Επιμελητής Β' ΕΣΥ Αγγειοχειρουργικής Κλινικής Π.Γ.Ν. Λάρισας

Τίτλος εργασίας στα αγγλικά:

" Types of thrombophilia and their laboratory investigation "

"Η διατριβή δημιουργήθηκε με Χρήση OpenOffice 4.1.7"

Ευχαριστίες

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Καθηγητή Βιοχημείας – κλινικής Χημείας κ. Αλέξανδρο Τσελέπη η χαρισματική διδασκαλία του οποίου εμφύσησε την επιθυμία μου να στραφώ προς την Αιματολογία και τις Θρομβοφιλικές διαταραχές. Οι απέραντες γνώσεις του και οι συζητήσεις μαζί του είναι ανεκτίμητες.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε υπό την επίβλεψη της Ειδικής Αιματολόγου και διδάκτωρος της ιατρικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Ελευθερίας – Ελμίνας Λευκού. Στην κ. Λευκού οφείλω ειλικρινείς και εκ βαθέων ευχαριστίες για την πολύτιμη, συνεχή, αδιάκοπη βοήθεια της που υπήρξε καταλυτική για την ολοκλήρωση της διατριβής αυτής. Την ευχαριστώ επίσης για την ανοχή και την αντοχή της, την καθοδήγηση της που αποτέλεσε πηγή φωτός σε καλές και δύσκολες εποχές.

Η παρούσα διατριβή δε θα είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη παρότρυνση του κ. Ιωάννη Γουδέβενου, Καθηγητή Καρδιολογίας, ο οποίος διακρίνεται για την επιστημονική κατάρτιση, εργατικότητα και έρευνα με αντικείμενο την Θρόμβωση.

Καταλυτική υπήρξε επίσης παρελθοντικά η προτροπή του Καθηγητή Fedor A. Serbineko, του Καθηγητή Alexander Potapov και του Καθηγητή Alexander Kononov να αξιοποιήσω με τον καλύτερο τρόπο τις δυνατότητες που μου προσφέρονται και να διευρύνω τους επιστημονικούς μου ορίζοντες. Τους ευχαριστώ για την υποδειγματική συνεργασία, την πολύτιμη καθοδήγηση, τα σχόλια, τις συμβουλές, και την ενθάρρυνση τους, όλα αυτά τα χρόνια που το επιστημονικό ερευνητικό κέντρο Νευροχειρουργικής N.N.Burdenko αποτέλεσε μία δεύτερη οικογένεια για μένα. Ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου παρείχαν, για την εξοικείωση μου με τεχνικές, για τη βοήθεια τους στην εκτέλεση των πειραμάτων και την εύρεση λύσεων στα προβλήματα που ανέκυπταν, αλλά κυρίως τους ευχαριστώ για την πολύτιμη συμπαράσταση τους που ήταν και είναι πηγή ελπίδας και δύναμης.

Εἷς εὖ φρονῶν μυρίων μὴ φρονούντων κρείττων ἐστί

Ένας καλώς σκεπτόμενος είναι ανώτερος μυρίων που δεν σκέπτονται καλά

Πλάτων

Περιεχόμενα

<i>Περίληψη</i>	6
<i>Abstract</i>	7
<i>I. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	8
<i>Ιστορική αναδρομή</i>	8
<i>Ορισμός Θρομβοφιλικών διαταραχών</i>	10
<i>Ταξινόμηση Θρομβοφιλικών διαταραχών</i>	11
<i>II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ</i>	14
<i>A1 Η μετάλλαξη του V leiden</i>	14
<i>A2 Η μετάλλαξη της Προθρομβίνης(FII)</i>	15
<i>A3 Έλλειψη Αντιθρομβίνης</i>	17
<i>A4 Έλλειψη πρωτεΐνης C</i>	19
<i>A5 Έλλειψη πρωτεΐνης S</i>	21
<i>A6 Τις διαταραχές του Ινωδογόνου(FI)</i>	23
<i>A7. Συγγενής έλλειψη του πλασμινογόνου</i>	24
<i>B1 Το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο</i>	24
<i>B2 Κύηση και Λοχεία.....</i>	29
<i>Γ1 Την Υπερομοκυστεϊναιμία</i>	30
<i>Υψηλά επίπεδα παραγόντων.....</i>	31
<i>Γ6. Έλλειψη του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου t-PA</i>	32
<i>Γ7. Αύξηση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1, PAI-132</i>	
<i>III. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ</i>	33
<i>Η εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας.....</i>	33
<i>Πώς και πότε πρέπει να γίνεται έλεγχος θρομβοφιλίας?</i>	34
<i>Πότε χρονικά σε σχέση με το θρομβωτικό επεισόδιο πρέπει να γίνονται οι εξετάσεις θρομβοφιλίας.....</i>	34

<i>Σε ποιους ασθενείς συστήνεται έλεγχος θρομβοφιλίας Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες.</i>	<i>35</i>
<i>Βασικές αρχές</i>	<i>37</i>
<i>Εργαστηριακές μέθοδοι διερεύνησης</i>	<i>37</i>
<i>A. Πηξιολογικές ή πηκτικές ή χρονομετρικές μέθοδοι.</i>	<i>37</i>
<i>A1. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού Prothrombin Time (PT ή Quick Time). ...</i>	<i>38</i>
<i>A2.Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (Activated Partial Thromboplastin Time - aPTT).</i>	<i>39</i>
<i>A3.Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού Ινωδογόνου (Fibrinogen).</i>	<i>39</i>
<i>A4.Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του παράγοντα II.</i>	<i>40</i>
<i>A5.Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του αντιπηκτικού του λύκου.....</i>	<i>40</i>
<i>B.Χρωμογόνες ή χρωματομετρικές μέθοδοι.</i>	<i>43</i>
<i>B1.Χρωμογόνα μέθοδος προσδιορισμού Αντιθρομβίνης (ATIII)</i>	<i>44</i>
<i>B2.Χρωμογόνα μέθοδος προσδιορισμού πρωτεΐνης C (Protein C – PC).....</i>	<i>45</i>
<i>Γ. Ανοσολογικές μέθοδοι.</i>	<i>46</i>
<i>Γ1.Ανοσοθολοσυμμετρική μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερης πρωτεΐνης C.</i>	<i>46</i>
<i>Γ2.Ανοσοθολοσυμμετρική μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερης πρωτεΐνης S.....</i>	<i>47</i>
<i>Γ3.Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA) του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1).</i>	<i>47</i>
<i>Γ4.Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA) του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator tPA).</i>	<i>48</i>
<i>IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</i>	<i>49</i>
<i>V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</i>	<i>51</i>

Περίληψη

Ο όρος θρομβοφιλία εισάγεται για πρώτη φορά από τον Egeberg το 1965, περιγράφοντας μία οικογένεια με θρομβωτικές τάσεις. Ορίζει μία διαταραχή εξαρτώμενη από κληρονομικά, επίκτητα και περιβαλλοντικά αίτια που συνδέεται με αυξημένη τάση για θρόμβωση. Επικρατέστερη εκδήλωση της η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος. Η θρομβοφιλία δεν αποτελεί νόσημα, άλλα σύνολο συνιστώσων που ευοδώνουν την θρόμβωση στα πλαίσια κάποιου πυροδοτικού μηχανισμού. Είναι ξεκάθαρο ότι το σύνολο των συνιστώσων αυτών δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί, αλλά ερευνάται και διευρύνεται. Γενικά, η θρόμβωση είναι υπερπηκτική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από το ασυνήθες των θρομβώσεων, επαναλαμβανόμενες θρομβώσεις, θρόμβωση σε νεαρή ηλικία, οικογενειακό ιστορικό καθώς και επιπλοκές της κύησης. Ο έγκαιρος προσδιορισμός θρομβοφιλικών συνιστώσων συμβάλει στην βέλτιστη διαμόρφωση της τακτικής αντιμετώπισης.

Abstract

The term thrombophilia is introduced for the first time by Egeberg in 1965, in order to describe a family with thrombotic tendencies. It defines a disorder dependent on inherited, acquired and environmental causes related to increased risk of thrombosis. The most prevalent indication is the venous thromboembolic disease. The thrombophilia is not a disease itself, but it is a number of factors that contribute to thrombosis. It is evident that the number of factors is not fully specified, but it raises through research. In general, thrombophilia is a hypercoagulable state that is characterized by unusual thrombosis, repeated thrombosis, thrombosis in young age, family record and pregnancy complications. The timely diagnosis of the thrombophilic factors conduces to the optimum treatment.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ιστορική Αναδρομή

Rudolf Carl Virchow, ο Γερμανός παθολόγος που πρώτος, το 1865, αναφέρθηκε στις ανωμαλίες στη σύσταση του αίματος ενοχοποιώντας τις για την ανάπτυξη θρόμβωσης. Η αρχική τοποθέτηση έγινε, γνωστή ως τριάδα του Virchow. Στην τριάδα αυτή αναφέρονται: η Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και ενεργοποίηση, η Στάση του αίματος και η Υπερπηκτικότητα. Ουσιαστικά τα τρία αυτά στοιχεία είναι ο πρώτη περιγραφή της Θρομβοφιλίας. Θρόμβωση για να υπάρξει θα πρέπει να υπάρξει ένας ή περισσότεροι συνδυασμοί των παραγόντων της τριάδας του Virchow. Το στοιχείο που δεν ήταν σε θέση ο Virchow να γνωρίζει την εποχή εκείνη, ήταν η γενετική προδιάθεση για την ανάπτυξη θρόμβωσης ¹



Rudolf Virchow, 1902.

Image: © Photos.com/Jupiterimages

Εικόνα 1α <https://www.britannica.com/biography/Rudolf-Virchow>

Από την εποχή του Virchow και για περίπου έναν αιώνα μελετών στην παθοφυσιολογία των θρομβοφιλικών διαταραχών, ο Egeber το 1965 εισάγει για πρώτη φορά τον όρο θρομβοφιλία. Ο όρος εμφανίζεται μετά την δημοσίευση μελέτης μιας Νορβηγικής οικογένειας, μεταξύ των μελών της οποίας παρατηρούνται φλεβικές θρομβώσεις με σημαντικές επιπτώσεις, λόγω έλλειψης ενός φυσικού αντιπηκτικού της αντιθρομβίνης². Τα επόμενα 55 χρόνια έγινε μελέτη και περιγραφή περισσότερων θρομβοφιλικών διαταραχών με μεγαλύτερη συχνότητα εμφανίσεων

στον γενικό πληθυσμό σε σχέση με την σχετικά σπάνια έλλειψη αντιθρομβίνης που περιέγραψε ο Egeber, με εκθετική αύξηση των δημοσιεύσεων.³ Σοβαρό πρόβλημα της δημόσιας υγείας αποτελεί η κυριότερη εκδήλωση των θρομβοφιλικών διαταραχών η φλεβική θρομβοεμβολική νόσος, τρίτη σε συχνότητα αγγειακή νόσος.

Ορισμός Θρομβοφιλικών διαταραχών

Ο ορισμός των θρομβοφιλικών διαταραχών περιλαμβάνει ένα συνδυασμό νοσημάτων ή παθολογικών καταστάσεων με αυξημένη υπερπηκτική προδιάθεση ο οποίος πυροδοτείται από ένα εκλυτικό αίτιο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η θρομβοφιλία δεν αποτελεί νόσημα άλλα σύνολο διαταραχών το οποίο σχετίζεται με αυξημένη προπηκτική προδιάθεση. Η εργαστηριακή αναγνώριση κάποιου γενετικού παράγοντα δεν τεκμηριώνει θρομβοφιλία. Αποτελεί όμως μία συνιστώσα η οποία σε συνδυασμό με άλλες επίκτητες συνιστώσες – διαταραχές, μπορεί να αυξήσει σημαντικά την πιθανότητα ανάπτυξης – εκδήλωσης κυρίως φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου στα πλαίσια πάντα κάποιου πυροδοτικού μηχανισμού. Υπο φυσιολογικές συνθήκες επικρατεί ισορροπία μεταξύ πήξης – ινοδόλυσης. Διαταραχή στο σκέλος της πήξης με αύξηση της πηκτικότητας οδηγεί σε αύξηση του θρομβωτικού κινδύνου ενώ μείωση της πηκτικότητας σε αύξηση της αιμορραγικής διάθεσης, διαταραχή στο σκέλος της ινοδόλυσης, με αύξηση της μετακινεί την ισορροπία προς την αιμορραγική διάθεση ενώ μείωση της ινοδόλυσης προς την θρομβωτική διάθεση.

Ταξινόμηση Θρομβοφιλικών διαταραχών

Η αιτιολογική ταξινόμηση των θρομβοφιλικών διαταραχών έχει να κάνει με δύο ομάδες, τις κληρονομικές και τις επίκτητες. Από μελέτες που συμπεριελάμβαναν ασθενείς με επιβεβαιωμένη φλεβική θρόμβωση είναι προφανές ότι οι αιτίες των θρομβοφιλικών διαταραχών είναι πολυπαραγοντικές. Η ανάδειξη μιας τρίτης ομάδας με αδιευκρίνιστης αιτιολογίας θρομβοφιλικές διαταραχές, συμπεριλαμβάνει τον συνδυασμό τόσο επίκτητων όσο και κληρονομικών αιτιών.⁴ Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύνολο των θρομβοφιλικών διαταραχών δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί και ένα ποσοστό αυτών παραμένει άγνωστο. Στην ταξινόμηση που ακολουθεί διαχωρίζονται 3 ομάδες διαταραχών. Οι κληρονομικές, σύμφωνα με αρκετούς συγγραφείς, διαχωρίζονται σε αυστηρώς κληρονομικές και πολυπαραγοντικές θρομβοφιλίες και οι επίκτητες. Οι κληρονομικές θρομβοφιλικές διαταραχές βασίζονται στο ίδιο μοντέλο, αρχικά σε κάποιο σημείο του γενετικού υλικού υπάρχει μια μεταβολή, όπως για παράδειγμα μία γενετική υποκατάσταση η οποία μπορεί να επιφέρει διαφοροποίηση της φαινοτυπικής έκφρασης, η διαφοροποίηση της φαινοτυπικής έκφρασης με την σειρά της μπορεί να οδηγήσει σε κλινική έκφραση συνιστώσας ικανής να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικού συμβάντος. Συνδυασμός συνέκφρασης πολλών συνιστώσων που η κάθε μια χωριστά αυξάνει τον κίνδυνο θρομβοεμβολικού συμβάντος έχει εκθετική αύξηση του ποσοστού εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων και όχι αθροιστική. Οι πολυπαραγοντικές - αδιευκρίνιστης αιτιολογίας θρομβοφιλίες οι οποίες αποτελούν ένα συνδυασμό από επίκτητα και κληρονομικά αίτια είναι λογικό να αποτελούν ξεχωριστή ομάδα. Μία ομάδα που μελλοντικά θα μεταβληθεί λόγω περιγραφών και μελετών που θα ακολουθήσουν. Πιν.1α

Σύμφωνα με τους μηχανισμούς της θρομβοφιλικής διάθεσης οι θρομβοφιλικές διαταραχές διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες. Α στις διαταραχές που προκύπτουν από μειωμένα επίπεδα φυσικών ανασταλτών της αιμόστασης. Μικρές ή μέτριες

μειώσεις των οποίων είναι ικανές να οδηγήσουν σε θρομβωτική διάθεση και εμφάνιση πρώτου επεισοδίου θρόμβωσης πριν την ηλικία των 60 ετών. Είναι σπανιότερες μεν διαταραχές με υψηλότερο δε κίνδυνο θρόμβωσης. Β στις διαταραχές που προκύπτουν από αυξημένη δραστικότητα παραγόντων της πήξης, ευοδώνουν μία ηπιότερη θρομβωτική διάθεση και εμφάνιση πρώτου επεισοδίου θρόμβωσης μετά την ηλικία των 60 ετών. Συναντιώνται συχνότερα οι διαταραχές αυτές με ηπιότερο κίνδυνο θρόμβωσης.^{5,6}

Θρομβοφιλικές Διαταραχές

A. Κληρονομικές ή Συγγενείς θρομβοφιλικές διαταραχές.

B. Επίκτητες θρομβοφιλικές διαταραχές.

Γ. Αδιευκρίνιστης αιτιολογίας θρομβοφιλικές διαταραχές.

Οι κληρονομικές ή Συγγενείς θρομβοφιλικές διαταραχές περιλαμβάνουν

A1. Την μετάλλαξη του V Leiden

A2. Την μετάλλαξη της Προθρομβίνης (FII)

A3. Την έλλειψη Αντιθρομβίνης

A4. Την έλλειψη της πρωτεΐνης C

A5. Την έλλειψη της πρωτεΐνης S

A6. Τις διαταραχές του Ινωδογόνου.

A7. Συγγενής έλλειψη του πλασμινογόνου

Οι επίκτητες θρομβοφιλικές διαταραχές περιλαμβάνουν

B1. Το Αντιφωσφολιπιδικό Σύνδρομο

B2. Κύηση και Λοχεία

B3. Ακινησία, Τραυματισμός, Χειρουργικές επεμβάσεις

B4. Παχυσαρκία

B5. Φάρμακα (Όπως : Χημειοθεραπευτικά, Αντισυλληπτικά)

B6. Κακοήθειες

B7. Αυτοάνοσα νοσήματα

B8. Νεφρωσικό Σύνδρομο

B9. Φλεγμονώδεις καταστάσεις

B10. Αιματολογικά νοσήματα

B11. Ανάπτυξη αναστολέων

Οι αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, θρομβοφιλικές διαταραχές, είναι παθήσεις που συνδέονται κυρίως με την φλεβική θρόμβωση. Μπορεί να είναι συγγενείς ή/και επίκτητες ή συνδυασμός αυτών.

Γ1. Την Υπερομοκυστεϊναιμία

Γ1. Υψηλά επίπεδα παραγόντα VIII

Γ2. Υψηλά επίπεδα παράγοντα IX

Γ3. Υψηλά επίπεδα παράγοντα XI

Γ4. Υψηλά επίπεδα Ινωδογόνου

Γ5. Αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, που δεν σχετίζεται με τον παραγοντα V Leiden ή τις μεταλλάξεις του.

Γ6. Έλλειψη του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, t-PA

Γ7. Αύξηση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1, PAI-1

Πίνακας 1α. Η αιτιολογική ταξινόμηση των θρομβοφιλικών διαταραχών.

II ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

A1 Η μετάλλαξη του V Leiden ⁷

Η ονομασία οφείλεται στην πόλη Leiden της Δανίας, όπου ανακαλύφθηκε, στο εργαστήριο διεύθυνσης του Prof. P. Reitsma το 1994, από τον καθηγητή R. Bertina. Αυτοσωμική κυρίαρχη μετάλλαξη με ατελή διείσδυση. Ως ατελής διείσδυση εκφάζεται η ποικιλομορφία του κλινικού φαινότυπου η οποία επηρεάζεται από κληρονομικούς, επίκτητους και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η αντικατάσταση της αργινίνης από γλουταμίνη στην θέση 1691 ή στην θέση 1746 (G1691A) του γονιδίου FV της πήξης δημιουργεί σημειακή μετάλλαξη, που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 (1p23), υπεύθυνη για την αύξηση της ανθεκτικότητας του παράγοντα V, για διάσπαση και αδρανοποίηση από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (activated protein C, APC), αύξηση της ανθεκτικότητας στην πρωτεολυτική της δράση. Εκτός από την κλασική μετάλλαξη περιγράφεται ο πολυμορφισμός του HR2 απλότυπου στο γονίδιο του FV, που η ύπαρξη μόνο ετεροζυγωτίας του πολυμορφισμού αυτού δεν θεωρείται θρομβοφιλία. Επιπρόσθετα έχουν περιγραφεί: η μετάλλαξη του Hong – Kong, (A306G), η μετάλλαξη του Cambridge (A306T), η μετάλλαξη Nara (T1920A), Liverpool (Isoleukin359Treonine) καθώς και Bone (Ala512Val). Η αρχική περιγραφή έγινε από τους Dahlback and Hildebrand το 1994^{7,8}. Η συχνότητα εμφάνισης στους Καυκάσιους κυμαίνεται έως 8,5%, ενώ για τους Ευρωπαίους είναι 5-8%^{9,10}. Ο θρομβωτικός κίνδυνος στον γενικό πληθυσμό είναι : 1/1000/έτος. Η ύπαρξη ετεροζυγωτίας του FV αυξάνει τον θρομβωτικό κίνδυνο κατά 4-8%. Η ύπαρξη άλλων παραγόντων θρομβοφιλικής διάθεσης αυξάνουν επιπλέον την πιθανότητα εκδήλωσης θρόμβωσης. Ομοζυγωτία της μετάλλαξης FV αυξάνει εκθετικά τον κίνδυνο θρόμβωσης σε 80/1000/έτος. Οι θρομβώσεις κατά κύριο λόγο

είναι φλεβικές.⁷ Αξίζει να αναφερθεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης VTE σε ετεροζυγώτριες που λαμβάνουν οιστρογονικά αντισυλληπτικά ή θεραπεία υποκατάστασης με ορμόνες είναι αυξημένος κατά 20 περίπου φορές.

Εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση A Screening test στο οποίο υπολογίζεται η ανθεκτικότητα στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Υπάρχουν δύο μέθοδοι. Στην πρώτη το τεστ βασίζεται στο aPTT, ενώ στην δεύτερη σε δηλητήριο φιδιού, όπως π.χ.: Dilute Russell's Viper Venom Time (DRVVT). Πραγματοποιούνται παράλληλα δύο τεστ, το ένα παρουσία μάρτυρα APC (φυσιολογικής ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C) και το άλλο απουσία μάρτυρα. Υπολογίζεται ο λόγος τους. Επί ύπαρξης της μετάλλαξης του FV και στα δύο τεστ υπάρχει ελάττωση του χρόνου πήξης. B Μοριακή εξέταση (PCR) Η μέθοδος βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση διάσπασης της γλυκοπρωτεΐνης του FV. Τα τελικά προϊόντα προσδιορίζονται σε διαφορετικά μοτίβα ζώνης σε Gel DNA. Η πρωτεΐνη που προκύπτει μετά την σημειακή μετάλλαξη διασπάται σε διαφορετικά σημεία κατά την αντίδραση πολυμερισμού, το αποτέλεσμα καθορίζεται από το τελικό προϊόν.⁷

A2 Η μετάλλαξη της προθρομβίνης (FII)

Το 1996 Poort και συνεργάτες περιγράφουν την σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης γουανίνης από αδερίνη στο νουκλεοτίδιο 20210 στην περιοχή 3' του γονιδίου της προθρομβίνης. Η μετάλλαξη δεν μεταβάλλει την δομή και την λειτουργία του μορίου της προθρομβίνης που προκύπτει, αλλά την καθιστά ανθεκτική στην αποδόμηση. Η επιβράδυνση της αποδόμησης οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της.¹¹ Ο λειτουργικός πολυμορφισμός που προκύπτει οδηγεί στην αύξηση της φυσιολογικής προθρομβίνης κατά 30% σε ετεροζυγωτία¹¹ και 70% περίπου σε ομοζυγωτία. Δημιουργείται κατά τέτοιο τρόπο μία προθρομβωτική συνιστώσα.¹¹ Η οποία αυξάνει κατά 2-4 φορές τον κίνδυνο θρόμβωσης για τους ετεροζυγώτες ενώ για τους ομοζυγώτες η αύξηση είναι μεγαλύτερη. Η επίπτωση στον γενικό πληθυσμό

κυμαίνεται από 0,7 έως 6,5%. Για την Ευρώπη το ποσοστό είναι 0,7 έως 4%, με μεγαλύτερο, σχεδόν διπλάσιο ποσοστό για την νότια Ευρώπη σχεδόν 3%, έναντι 1,7% για την βόρεια.¹² Εξαιρετικά σπάνια μετάλλαξη για Ασιατικές και Μαύρες φυλλές. Η αύξηση του θρομβωτικού κινδύνου είναι περίπου 2,8 φορές μεγαλύτερη για τους ετεροζυγώτες σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό, με ακόμη μεγαλύτερη συχνότητα για τους ομοζυγώτες.¹³ Σε ασθενείς συμπτωματικούς, συχνά συνυπάρχουν άλλες κληρονομικές μεταλλάξεις. Χαρακτηριστικό είναι ότι συνύπαρξη ετεροζυγωτίας του FV Leiden αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης εν τω βάθι φλεβικής θρόμβωσης κατά 3 με 5 φορές σε σχέση με την μονή ετεροζυγωτία της μετάλλαξης της προθρομβίνης.¹⁴ Η προθρομβίνη (FII) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη 72kDa που ενεργοποιείται από τον παράγοντα Χα παρουσία του Va, Ca²⁺, φωσφολιπιδίων και μετατρέπεται σε θρομβίνη καθώς λαμβάνει διάσπαση το μόριο της, στις θέσεις Arg271-Thr272, και Arg 320-Interleukin 321. Το θεμελιώδες αυτό ένζυμο της θρομβίνης έχει αιμοστατικές, αντιπηκτικές και ινωδολυτικές ιδιότητες. Πιν. 2α Το γονίδιο της προθρομβίνης (FII), εδράζει στο χρωμόσωμα 11 (11p11-q12) αποτελείται από 14 εξόνια, 13 ιντρόνια και τις αμετάφραστες περιοχές 5' και 3', οι οποίες ρυθμίζουν την έκφραση του. Είναι γνωστό ότι τα υψηλά επίπεδα προθρομβίνης προκαλούν την αύξηση των επιπέδων του ενεργοποιούμενου από την θρομβίνη αναστολέα της ινωδόλυσης^{15,16,17} και πιθανή αναστολή της αδρανοποίησης του παράγοντα Va από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C^{15,16,17,18}. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης VTE σε ετεροζυγώτριες που λαμβάνουν οιστρογονικά αντισυλληπτικά ή θεραπεία υποκατάστασης με ορμόνες είναι αυξημένος κατά 15 περίπου φορές.

Εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση γίνεται με PCR. Προσδιορισμός του χρόνου προθρομβίνης επιβάλει απαίτηση αντιδραστηρίου PT, ΧΡΟΝΟΣ ΠΡΟΘΡΟΜΒΙΝΗΣ, INR, (%) το αντιδραστήριο για την εξέταση χρόνου προθρομβίνης (PT), να είναι ανθρώπινη ανασυνδυασμένη θρομβοπλασίνη με ISI περίπου 1. Για λόγους ευκολίας, ακρίβειας και αποφυγής επιμολύνσεων κατά την ανασύσταση το αντιδραστήριο να περιέχει δικό του διαλύτη.

Ιδιότητες της Θρομβίνης

A Αιμοστατικές :

A1 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

A2 Ενεργοποίηση του παράγοντα VIII

A3 Ενεργοποίηση του παράγοντα V

A4 Ενεργοποίηση του παράγοντα XI

A5 Ενεργοποίηση του παράγοντα XIII

B Αντιπηκτικές:

B1 Ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C

Γ Ινωδολυτικές:

Γ1 Ενεργοποίηση του από την Θρομβίνη Ενεργοποιούμενο Αναστολέα της
Ινωδόλυσης (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor {TAFI})

Πίνακας 2α. Οι ιδιότητες της Θρομβίνης

A3 Την έλλειψη Αντιθρομβίνης

Η πρώτη εισαγωγή του όρου αντιθρομβίνη λαμβάνει θέση το 1905 από τον Paul Moravitz στο πανεπιστήμιο του Tubingen, για να περιγράψει την ικανότητα του πλάσματος να αδρανοποιεί την θρομβίνη σε οικογένεια που τα μέλη της παθαίνουν θρομβώσεις από νεαρή ηλικία. Ο Olav Egeberg το 1965 περιγράφει μία άλλη οικογένεια με κληρονομική έλλειψη ATIII. Η έλλειψη αντιθρομβίνης η οποία λειτουργεί ως φυσικός ανασταλτής της πήξης, φυσιολογικός αναστολέας των πρωτεασών της ομάδας της Σερίνης, συνδέοντας και απενεργοποιώντας την

θρομβίνη(FIIa), FIXa, FXa, FXIa,FXIIa, πλασμίνης και προκαλικρεΐνης οδηγεί στην δημιουργία μιας ισχυρής θρομβοφιλικής συνιστώσας που ενισχύει την εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Μεταβιβάζεται με αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, ο οποίος εδράζει στο μακρύ άκρο του χρωμοσώματος 1 στην θέση 25.1(1q23-25) (Γονίδιο SERPINC 1). Περιγράφονται περισσότερες από 130 μεταλλάξεις του γονιδίου της AT. Ο επιπολασμός της κυμαίνεται από 1:2000 - 1:5000, υπολογίστηκε με μετρήσεις της στο πλάσμα και τη χρήση ανοσολογικών μεθόδων. Μεταγενέστερα λειτουργικές μέθοδοι που μετρούν την δραστικότητα της ως συμπαράγοντα της ηπαρίνης αναδεικνύουν επιπλασμό περίπου 1:500.^{19,20} Δεν υπάρχουν φυλετικές διακρίσεις. Ιδιαίτερα σπάνια είναι η ομόζυγη μορφή, συνήθως θανατηφόρα, στα νεογνά όπου εκδηλώνεται με θρομβώσεις. Η ετερόζυγη κατάσταση είναι η συχνότερη της και την συναντάται σχεδόν αποκλειστικά. Στην κληρονομική ανεπάρκεια της ATIII διακρίνονται δύο υπότυποι. Στον τύπο I υπάρχει ελαττωμένη δραστικότητα με ελαττωμένη συγκέντρωση ATIII ενώ στον τύπο II ελαττωμένη δραστικότητα με φυσιολογική συγκέντρωση. Ο τύπος II έχει 3 υπότυπους α: IIRS Διαταράσσεται το ενεργό κέντρο - Reactive Site της αντιθρομβίνης β: IIHBS Η διαταραχή προκύπτει στην θέση σύνδεσης με την ηπαρίνη-Heparin Binding Site, οι ομοζυγώτες της διαταραχής αυτής εμφανίζουν τόσο φλεβικές όσο και αρτηριακές θρομβώσεις γ:IIPE Στον τύπο αυτό θέση έχουν μεταλλάξεις με πλειοτροπική δράση-Pleiotropic Effect, η παραγόμενη αντιθρομβίνη είναι μειωμένη και μεταλλαγμένη ως αποτέλεσμα μειωμένης σύνθεσης και έκκρισης αλλά και αυξημένου καταταβολισμού. Ετεροζυγώτες τύπου I στην συγγενή έλλειψη ATIII εμφανίζουν εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση από την ηλικία των 15 ετών και πριν το 50 έτος της ηλικίας τους σε ποσοστό περίπου 60% ^{21,22}. Οι ετεροζυγώτες τύπου II έχουν πιθανότητες εμφάνισης VTE σε ποσοστό 6-20%. Η AT είναι πρωτεΐνη της οικογένειας των σερπινών βάρους 58 kDa, με δύο λειτουργικές θέσεις στο μόριο της. Η μία θέση σύνδεσης της ηπαρίνης στο αμινοτελικό άκρο του μορίου της (Heparin Binding Site {HBS}) και η άλλη θέση σύνδεσης της αγκύλης του αντιδραστικού κέντρου στο καρβοξυτελικό άκρο του μορίου της (Reactive Center Loop {RCL}). Η παρουσία ηπαρίνης συνεργικά αυξάνει την αντίδραση ανάμεσα στην ATIII τον παράγοντα Xa και την θρομβίνη ή και άλλων πρωτεασών – στόχων, μέχρι και 200 φορές, ενισχύοντας την δραστική αναστολή της πήξης. Οι φυσιολογικές τιμές της ATIII είναι : Συγκέντρωση 0,19-0,31gr/l, Δραστικότητα 80-120%. Διακυμάνσεις παρατηρούνται από διάφορα

φάρμακα. Για παράδειγμα η ηπαρίνη, τα οιστρογόνα, η ασπαραγινάση, τα αντισυλληπτικά φάρμακα μειώνουν τις τιμές της ΑΤΠΙ ενώ η βαρφαρίνη και τα αναβολικά στεροειδή αυξάνουν την τιμή της.²³ Η ανεπάρκεια αντιθρομβίνης είναι το κληρονομικό αίτιο θρομβοφυλίας που συνδέεται με τον μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικής νόσου. Επίκτητη ανεπάρκεια αντιθρομβίνης παρατηρείται λόγω μειωμένης σύνθεσης σε ηπατικά νοσήματα, φλεγμονώδη νοσήματα και εκγυμνάσματα, ενώ λόγω αυξημένης κατανάλωσης σε κακοήθειες, θρομβωτικές μικροαγγειοπάθειες, αιμόλυση από ασύμβατη μετάγγιση, σήψη, διάχυτη ενδαγγειακή πήξη, νεφρωσικό σύνδρομο όπως και φαρμακευτικά επαγόμενης ανεπάρκειας από ηπαρίνη ή L-ασπαραγινάση.

Η εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση λαμβάνει θέση με ανοσολογικούς προσδιορισμούς (ποσοτική μέθοδος), καθώς και λειτουργικές μεθόδους (ποιοτικός προσδιορισμός). Διαθέσιμες δοκιμασίες: Λειτουργικότητα (αντι-Πα και αντι-Χα, πιξιολογική και χρωμογονική) και αντιγονικότητα (ELISA). Ψευδώς χαμηλές τιμές παρατηρούνται μετεγχειρητικά, στην κύηση, λήψη αντισυλληπτικών, χημειοθεραπευτικών.

A4 Η έλλειψη της πρωτεΐνης C

Η έλλειψη πρωτεΐνης C η οποία λειτουργεί ως φυσικός ανασταλτής της πήξης ενεργοποιείται φυσιολογικά από το σύμπλεγμα της ήδη παραγόμενης θρομβίνης με την ενδοθηλιακή πρωτεογλυκάνη θρομβομοντουλίνη, αδρανοποιώντας τους παράγοντες Va και Vlla, οι οποίοι ενεργοποιούν τον παράγοντα X και την παραγωγή θρομβίνης, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στον έλεγχο εξάπλωσης του θρόμβου εξισορροπώντας την ζυγαριά ανάμεσα στους θρομβωτικούς και αιμορραγικούς μηχανισμούς, παρεμποδίζοντας την διαδικασία της πήξης. Για να λάβει θέση η αντίδραση αυτή απαιτείται η συμμετοχή της πρωτεΐνης S που δρα ως συμπαράγοντας.

Παρουσία πρωτεΐνης S η καταλυτική της δράση αυξάνει σημαντικά. Κληρονομείται με αυτοσωματικό επικρατούντα χαρακτήρα με ποικίλη διεισδυτικότητα και η πρώτη περιγραφή και συσχέτιση με την φλεβική θρόμβωση γίνεται το 1981 από τους Griffin και συνεργάτες ²⁴. Το πλήθος των ασθενών είναι ετεροζυγώτες με επίπεδα πρωτεΐνης περίπου στο 50% των φυσιολογικών επιπέδων, κατάσταση η οποία οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου θρόμβωσης κατά 6 έως 10 φορές, ιδιαίτερη εκδήλωση της αποτελεί η εμφάνιση δερματικών νεκρώσεων κατά την έναρξη θεραπείας με ανταγωνιστές της βιταμίνης K, ενώ εξαιρετικά σπάνιοι είναι οι ομοζυγώτες με παντελή έλλειψη πρωτεΐνης C, που συνδέεται με εμφάνιση σοβαρών θρομβώσεων στη νεογνική περίοδο, χαρακτηριστικό είναι το σύνδρομο της νεογνικής κεραυνοβόλου πορφύρας – neonatal purpura fulminans. Εδράζει στο χρωμόσωμα 2 (2q13-14) που αποτελείται από 9 εξώνια. Περιγράφονται πάνω από 195 σημειακές μεταλλάξεις αντικατάστασης, ενός αμινοξέος, προκαλώντας δύο τύπους. Ο τύπος I αφορά ποσοσοτική διαταραχή των αντιγονικών επιπέδων και της δραστηριότητας, με ποσοστό περίπου 50% των φυσιολογικών αντιγόνων για τους ετεροζυγώτες, ενώ για συνδυασμούς μεταλλάξεων τα επίπεδα είναι μικρότερα του 25%²⁵. Ο τύπος II αφορά λειτουργική διαταραχή, μειωμένη δραστηριότητα πρωτεΐνης C με φυσιολογικά επίπεδα αυτής αφορά συνήθως τις περιοχές σύνδεσης των υποστρωμάτων της θρομβομοντουλίνης ή του ασβεστίου, συναντάται στο 10% περίπου των μεταλλάξεων. Είναι μία εξαρτώμενη από την βιταμίνη K πρωτεΐνη 62kDa και αποτελείται από δύο αλυσίδες που συνδέονται με δισουλφικές γέφυρες. Υπάρχει μεγάλη φαινοτυπική διαφοροποίηση στον γενικό πληθυσμό έτσι ώστε σε ποσοστό 10 έως 30% να εμφανίζουν εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση φορείς μίας θρομβοφιλικής διαταραχής, ενώ υπάρχει εκθετική αύξηση όταν συνυπάρχουν δύο ή περισσότερες διαταραχές²⁶. Η συχνότητα έκφρασης στον γενικό πληθυσμό υπολογίζεται από 1:200 – 1:500²⁷. Επίκτητη έλλειψη παρατηρείται σε ηπατοπάθειες, θεραπεία με οιστρογονικά αντισυλληπτικά, ορμονοθεραπεία, χορήγηση κουμαρινικών αντιπηκτικών.

Διαθέσιμες δοκιμασίες εργαστηριακής διερεύνησης Α λειτουργική (πηξιολογική και χρωμογονική) και Β αντιγονική (ELISA) δοκιμασία. Προτιμάται: λειτουργική χρωμογονική. Φυσιολογικές τιμές: 70-140 %. Ψευδώς χαμηλές τιμές έχουμε κατά την λήψη κουμαρινικών, χημειοθεραπευτικών. Απαίτηση ως προς το αντιδραστήριο ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ C, Protein C activity, Χρωμογονικής μεθόδου για

τον ποσοτικό προσδιορισμό της Πρωτεΐνης C. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση των αντιδραστηρίων τουλάχιστον 2 μήνες στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο. Η αντίσταση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C γίνεται με APTT screening test με ή χωρίς την προσθήκη FV Deficient Plasma, τα αποτελέσματα εκφράζεται σε sec ή σε κανονικοποιημένο λόγο-NR, PCR μπορεί να γίνεται για επιβεβαίωση. Απαίτηση ως προς το αντιδραστήριο ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ C , APC Resistance, το αντιδραστήριο για τη μέτρηση της APC Resistance (Factor V Leiden) να είναι πλήρες kit και ακολουθεί τη μέθοδο APTT με χρήση παράγοντα V Leiden.

A5 Η έλλειψη της πρωτεΐνης S

Η πρωτεΐνη S οφείλει το όνομα της στο Seattle, Washington όπου ανακαλύφθηκε. Συμπαράγοντας της πρωτεΐνης C, αντιπηκτική γλύκο-πρωτεΐνη επίσης εξαρτώμενη από την βιταμίνη K, μοριακού βάρους 75kDa. Ενισχύει καταλυτικά την δράση της πρωτεΐνης C στην ενεργοποίηση των παραγόντων V και VIII. Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο γονίδιο της PS (PROS1) στο χρωμόσωμα 3 (3p11), περιγράφονται πάνω από 200 σημειακές μεταλλάξεις ή προσθήκες ή μικρές ελλείψεις που ενοχοποιούνται για την ανεπάρκεια της PS. Μετά την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C σε APC, η πρωτεΐνη S συνδέεται με την APC αυξάνοντας καταλυτικά την δράση της κατά 20 περίπου φορές υδρολύοντας τον παράγοντα Va στην θέση Arg306, με συνεργική αδρανοποίηση και του VIIIa. Η επίπτωση στον γενικό πληθυσμό είναι μικρή περίπου 1:350²⁸. Πάσχοντες με επίπεδα ελεύθερης πρωτεΐνης S μικρότερα των 41 iu/dl, έχουν περισσότερες πιθανότητες εμφάνισης θρομβοεμβολικού συμβάματος, σε σχέση με άτομα με υψηλότερα επίπεδα²⁹. Αξίζει να αναφερθεί ότι η μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης S οδηγεί σε υποεκτίμηση του κινδύνου θρόμβωσης, για τον λόγο αυτό είναι προτιμότερη η μέτρηση της ελεύθερης πρωτεΐνης S, διότι μόνο η ελεύθερη

πρωτεΐνη S δρα ως συμπαράγοντας της πρωτεΐνης C³⁰. Θεωρείται ότι η πρωτεΐνη S δρα στο σύστημα της προθρομβινάσης και στον Χα ανεξάρτητα από την ενεργό πρωτεΐνη C³¹. Διακρίνονται 3 υπότυποι : Ο τύπος I αποτελεί διαταραχή, συνδυασμού μείωσης αντιγονικής δραστηριότητας κατά 50% και σημαντικής ελάττωσης της βιολογικής δραστηριότητας, Ο τύπος II αποτελεί ποιοτική διαταραχή (cofactor activity), λειτουργικές διαταραχές του μορίου της πρωτεΐνης οδηγούν σε έκπτωση της βιολογικής δραστηριότητας, ενώ ο τύπος III είναι ποσοτική διαταραχή της ελεύθερης πρωτεΐνης S, που συνδυάζει επιλεκτική μείωση των επιπέδων της ελεύθερης πρωτεΐνης S με φυσιολογική αντιγονική δραστηριότητα, αλλά έκπτωση της βιολογικής δραστηριότητας κάτω από το 40% της φυσιολογικής τιμής. Μεγάλο ποσοστό ασθενών, περίπου 80%, με έλλειψη της PS, θα εμφανίσει φλεβική κυρίως θρόμβωση. Η ομοζυγωτική κατάσταση εκδηλώνεται από την νεογνική ηλικία (purpura fulminans), με παθολογική θρόμβωση μικρών αγγείων που οδηγεί σε δερματικές και υποδερματικές νεκρώσεις κατά το πρώτο έτος της ζωής. Υπάρχει συσχέτιση της PS με την επαγόμενη από την βαρφαρίνη δερματική νέκρωση. Επίκτητη έλλειψη παρατηρείται σε ηπατοπάθειες, θεραπεία με οιστρογονικά αντισυλληπτικά, ορμονοθεραπεία, χορήγηση κουμαρινικών αντιπηκτικών καθώς στην κύηση και την λοχεία.

Η εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση λαμβάνει θέση Α Με μέτρηση των επιπέδων του αντιγόνου της πρωτεΐνης S. Β Πηξιολογικά τεστ ελέγχου δραστηριότητας. Διαθέσιμες δοκιμασίες Λειτουργικότητας και αντιγονικότητας ελεύθερης πρωτεΐνης S, αντιγονικότητα ολικής πρωτεΐνης S. Προτιμάται η λειτουργικότητα της PS (Funcionality PS) σε latex ή με ανοσοθολωσιμετρία. Φυσιολογικές τιμές για τους άντρες: 60-140 %, για τις γυναίκες: 54-140%. Ψευδώς χαμηλές τιμές παρατηρούνται μετεγχειρητικά, στην κύηση, λήψη κουμαρινικών, χημειοθεραπευτικών. Απαιτήσεις για το αντιδραστήριο ΠΟΣΟΤΙΚΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ S, Free Protein S Antigen, με ανοσολογική μέθοδο με σύνδεση σωματιδίων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Ελεύθερης Πρωτεΐνης S. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση των αντιδραστηρίων τουλάχιστον 1 μήνα στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο τους.

A6 Τις διαταραχές του Ινωδογόνου(FI)

Το ινωδογόνο είναι ένα σύμπλεγμα γλυκοπρωτεϊνών που παράγεται κυρίως από τα ηπατοκύτταρα και εκκρίνεται στο αίμα. Οι γλυκοπρωτεΐνες ελέγχονται από τρία γονίδια (FGA, FGB, FGG), τα οποία εδράζουν στο χρωμόσωμα 4³². Το μοριακό βάρος του γλυκοπρωτεϊνικού συμπλέγματος είναι περίπου 340 KDa, η φυσιολογική συγκέντρωση του στο πλάσμα είναι 150 έως 400 mgr/dl με μέσο χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 4 ημέρες³³. Φυσιολογικά μετά από τραυματισμό υπό την επίδραση της θρομβίνης μετατρέπεται σε ινική και στην συνέχεια σε θρόμβο. Μεταλλάξεις στην αποκωδικοποίηση των γονιδίων οδηγούν στην συγγενή παραγωγή γλυκοπρωτεϊνών που έχουν διαφορετική λειτουργικότητα ή στην μείωση της παραγωγής τους ή συνδυασμό μειωμένης παραγωγής και λειτουργικών διαταραχών. Τα άτομα με τις διαταραχές αυτές μπορεί να εκδηλώσουν παθολογικές θρομβώσεις ή αιμορραγίες ή εναπόθεση του ινωδογόνου αυτού σε όργανα και ιστούς. Διακρίνονται διαταραχές όπως Α Ανινοδωγοναιμία (Πλήρης έλλειψη ινωδογόνου) Β Υποϊνωδογοναιμία (Ποσοτική διαταραχή του ινωδογόνου) Γ Δυσινοδωγοναιμία (Ποιοτική διαταραχή του ινωδογόνου) Δ Υποδυσινοδωγοναιμία (Συνδυασμός ποιοτικής και ποσοτικής διαταραχής). Επίκτητες διαταραχές του ινωδογόνου σχετίζονται με ηπατικά νοσήματα, διαταραχές της ηπατικής λειτουργίας στα πλαίσια ίκτερου, κίρρωσης, ηπατίτιδας, ηπατώματος, απόφραξης χολικών οδών, σήψης, διάχυτης ενδαγγειακής πήξης, τραυματισμού, μεταγρίσεων με Συμπυκνωμένα Ερυθρά, κλπ. Μία επίκτητη διαταραχή στην οποία το ινωδογόνο καθιζάνει σε χαμηλές θερμοκρασίες ονομάζεται Κρυοϊνωδογοναιμία. Η καταβύθιση του ινωδογόνου μπορεί να συμπαρασύρει και άλλες κυκλοφορούσες πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχαιμίας του ψυχρού μέλους. Η κρυοϊνωδογοναιμία διαχωρίζεται σε Πρωτοπαθή (απουσία υποκείμενης νόσου) και Δευτεροπαθή (ύπαρξη υποκείμενου νοσήματος)³⁴.

Εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση στηρίζεται σε σύνθετες μεθόδους, στην βάση των οποίων υπάρχει η μέτρηση των αιμοπεταλίων, η σύνδεση των αιμοπεταλίων με το ινωδογόνο και την ινική, καθώς και μετρήσεις σύνθεσης και αποδομής του θρόμβου (θρομβοελαστομετρία)³⁵. Απαίτηση για το αντιδραστήριο

FIB, INΩΔΟΓΟΝΟ, το αντιδραστήριο για την εξέταση ινωδογόνου να ακολουθεί τη μέθοδο Clauss. Θα αξιολογηθεί ιδιαίτερα η δυνατότητα ανίχνευσης χαμηλών επιπέδων ινωδογόνου (χαμηλής συγκεντρώσης).

A7. Συγγενής έλλειψη του πλασμινογόνου

Σπάνια γενετική διαταραχή που κληρονομείται με αυτοσωματικό τρόπο, αναφέρονται μεμονωμένα οικογενή περιστατικά. Διακρίνονται δύο τύποι Α τύπος Ι Μειωμένη έκφραση του αντιγόνου με παράλληλη έκπτωση της λειτουργικότητας-δραστικότητας. Εκφράζεται στους ετεροζυγώτες ως Υποπλασμινογοναιμία, ενώ στους ομοζυγώτες ως Απλασμινογοναιμία. Β τύπος ΙΙ Φυσιολογική έκφραση του αντιγόνου με έκπτωση της λειτουργικότητας-δραστικότητας, εκφράζεται ως Δυσπλασμινογοναιμία.

B1 Το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο

Ο όρος αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο (Σύνδρομο Hughes) περιλαμβάνει εκδηλώσεις τόσο κλινικές όσο και εργαστηριακές, αποτελεί άνοσης αρχής επίκτητη θρομβοφιλική διαταραχή και συσχετίζεται με την επίμονη παρουσία αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων, όπως το αντιπηκτικό του λύκου, τα αντικαρδιολιπινικά αντισώματα και τα αντισώματα έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης Ι. Χαρακτηρίζεται από θρομβώσεις, τόσο φλεβικές όσο και αρτηριακές καθώς και σημαντική νοσηρότητα - επιπλοκές κατά την κύηση επηρεάζοντας την αρνητικά. Η διάγνωση του βασίζεται στα κριτήρια του Sapporo αναθεώρηση των οποίων έγινε το 2006 στο Sydney³⁶. Πιν. 2β

Αναθεωρημένα κριτήρια ταξινόμησης Αντιφωσφολιπιδικού Συνδρόμου

Sapporo criteria (Sydney updated 2006)

A Κλινικά κριτήρια

A1. Αγγειακή θρόμβωση. Κλινική εκδήλωση ενός ή περισσότερων επεισοδίων αρτηριακής θρόμβωσης, φλεβικής θρόμβωσης ή θρόμβωσης μικρών αγγείων σε οποιοδήποτε όργανο ή ιστό.

A2 Νοσηρότητα κύησης.

A2α ≥ 1 εμβρυικός θάνατος μετά την 10η εβδομάδα της κύησης, με τεκμηρίωση της φυσιολογικής εμβρυϊκής μορφολογίας είτε υπερηχογραφικά είτε παθολογοανατομικά με άμεση εξέταση του νεκρού εμβρύου.

A2β ≥ 1 πρόωρος τοκετός υγιούς μορφολογικά βρέφους, πριν από την 34η εβδομάδα της κύησης στα πλαίσια εκλαμψίας, προεκλαμψίας ή πλακουντικής ανεπάρκειας.

A2γ ≥ 3 ανεξήγητες αποβολές πριν την 10η εβδομάδα της κύησης, με αποκλεισμό χρωμοσωμικών, ανατομικών ή ορμονικών αιτιών.

B Εργαστηρικά κριτήρια

Επίμονη παρουσία αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων για διάστημα τουλάχιστον 12 εβδομάδων.

B1 Αντιπηκτικό του λύκου

B2 Αντικαρδιολιπινικά αντισώματα, IgM ή IgG

B3 Αντισώματα έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης I, IgM ή IgG

Πίνακας 2β³⁶

Σαφώς υπάρχουν και αρκετά δευτερογενή κριτήρια στην διάγνωση του αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου, πολλά εκ των οποίων έχουν κοινά σημεία με τα κριτήρια διάγνωσης του ΣΕΛ³⁷. Χαρακτηριστικό κριτήριο σε ασθενή με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι η δικτυωτή πελίδνωση (Livedo reticularis), όπως επίσης και αντισώματα έναντι Αντιανεξίνης, Σερίνης, Προθρομβίνης κλπ, τα οποία δεν συμπεριλαμβάνονται επί του παρόντος στα κριτήρια διάγνωσης. Δεδομένης της ύπαρξης πολλών ομοιοτήτων μεταξύ αντιφωσφολιπιδικού συνδρόμου και ΣΕΛ, μπορεί να υπάρξει προσβολή σχεδόν όλων των οργάνων του οργανισμού με μια κλινική εικόνα σημαντικής ετερογένειας και αντιστοιχίας με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας αυτής και σε αντιστοιχία με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα η διάγνωση δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρη, αλλά μπορεί να είναι προγενέστερη ή μεταγενέστερη άλλου νοσήματος ή ψυχικής διαταραχής. Η αποσαφήνιση της παθογένειας της νόσου αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας, αρχικά είχε προταθεί ότι τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα στρέφονται άμεσα έναντι της φωσφατιδυλοσερίνης που φυσιολογικά εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Πρόσφατα όμως αποδείχθηκε ότι παρατηρείται διαταραχή στην ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να διακρίνει τα στοιχεία του εαυτού από τα αλλότρια (self tolerance) με αποτέλεσμα την κινητοποίηση της ανοσολογικής απάντησης προς στοιχεία του εαυτού του και συγκεκριμένα κατά πρωτεϊνών του πλάσματος με συγγένεια για αυτά τα ανιονικά φωσφολιπίδια. Τα

αντισώματα αυτά είναι επίμονα, έχουν ειδικότητα κατά συγκεκριμένων επιτόπων της $\beta 2$ γλυκοπρωτεΐνης και σχετίζονται κλινικά με θρομβωτικές επιπλοκές³⁸. Αντισώματα, η ανάπτυξη των οποίων σχετίζεται με την παρουσία λοιμώξεων ή με την λήψη φαρμάκων, κατά άλλων επιτόπων, μη ειδικά για την $\beta 2$ γλυκοπρωτεΐνη, είναι παροδικά και λιγότερο κλινικά σημαντικά^{39,40}. Ορισμένα αυτοαντιγόνα αναγνωρίζονται από αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα τα οποία ενεργοποιούνται, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση προς εκτελεστικά κύτταρα. Δηλαδή Β κύτταρα που παράγουν αυτοαντισώματα και αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα που παρέχουν σήματα συνδιέγερσης στα Β κύτταρα όπως και αυτοδραστικά κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα. Είναι αυτοαντισώματα που εναποτίθενται στους ιστούς με τη μορφή ανοσοσυμπλεγμάτων με αποτέλεσμα να κινητοποιούν φλεγμονώδεις διεργασίες και να προκαλούν ιστικές βλάβες⁴¹. Η πιθανή συνύπαρξη διαταραχών στο μηχανισμό κάθαρσης νεκρών και αποπτωτικών κυττάρων παρέχει στα αυτοδραστικά λεμφοκύτταρα τη δυνατότητα να έρθουν σε επαφή με αυτοαντιγόνα για παρατεταμένο χρόνο. Παρά την σημαντική ετερογένεια στην κλινική εικόνα, συνηθέστερα το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο προσβάλλει γυναίκες. Διακρίνονται δύο τύποι Αντιφωσφολιπιδικού Συνδρόμου Α Πρωτοπαθές (Απουσία ύπαρξης νοσημάτων άνοσης αρχής) Β Δευτεροπαθές (Ύπαρξη νοσήματος άνοσης αρχής, όπως π.χ. : RA, ΣΕΛ, Νόσος Sjogren, Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, κλπ.) Κλινικοί υπότυποι και ειδικές κατηγορίες του ΑΦΣ περιλαμβάνουν α Το γενικευμένο ΑΦΣ β Το καταστροφικό ΑΦΣ γ Το εγκεφαλικό ΑΦΣ δ Το Αρτηριακό ΑΦΣ ε Το παιδιατρικό ΑΦΣ στ Το μαιευτικό ΑΦΣ στ1 Πρωτοπαθές στ2 Γενικευμένο ζ Το καρδιολογικό ΑΦΣ η Το νεφρολογικό ΑΦΣ

Εργαστηριακή διερεύνηση και διάγνωση βασίζεται στην ανίχνευση αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων: Αντισώματα έναντι της $\beta 2$ γλυκοπρωτεΐνης I, IgM ή IgG (>99η εκατοστιαία θέση), Αντικαρδιολιπινικά (anticardiolipin – aCL) αντισώματα (>99η εκατοστιαία θέση), IgM phospholipid units (>40 MPL/ml) ή IgG phospholipid units (>40 GPL/ml) και το αντιπηκτικό του λύκου. Η ανίχνευση αντισωμάτων θα πρέπει να σχετίζεται με αγγειακή θρόμβωση ή νοσηρότητα της κύησης, σε δύο τουλάχιστον εργαστηριακούς ελέγχους με μεσοδιάστημα περίπου 3 μηνών. Πίνακας 2β Λαμβάνονται υπ' όψιν δευτερογενή κριτήρια όπως η Δικτυωτή Περίδωση (Livedo reticularis), Θρομβοπενία, Αιμολυτική αναιμία, Νευρολογικές

εκδηλώσεις μη θρομβωτικής αιτιολογίας, Διάμεση μυελίτιδα, Νεφροπάθεια, Ψευδώς θετικό τεστ για σύφιλη, Παράταση στον ενεργοποιημένο χρόνο μερικής θρομβοπλαστίνης (activated Partial Thromboplastin Time – aPTT), καθώς επίσης και προσδιορισμός άλλων αντισωμάτων όπως για παράδειγμα έναντι Annexin V (πλακουντιακή αντιπηκτική πρωτεΐνη), αντι-προθρομβινικά αντισώματα, αντι-φωσφατιδυλσερίνης αντισώματα, αντι-φωσφατιδυλαιθανολαμίδης αντισώματα, αντισώματα έναντι κινινογόνου, αντικαρδιολιπινικά αντισώματα IgA, αντισώματα έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης I IgA. Η θρομβοπενία συναντάται σε έναν στους 3 ασθενείς συνολικά με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ενώ απαντάται κατά την διάγνωση σε έναν στους τέσσερις με πέντε ασθενείς, ακόμη και με χαμηλές τιμές αιμοπεταλίων η θρομβοπενία μπορεί να σχετίζεται με εμφάνιση παράδοξης θρόμβωσης, ενώ δύναται να συνυπάρχει κίνδυνος αιμορραγίας όταν ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι μικρότερος των 50000. Η ύπαρξη χαμηλών τίτλων θετικών αντιπυρινικών αντισωμάτων που δεν συνδέονται με τον Συστηματικό Ερυθηματώδη Λύκο είναι συχνή. Σύμφωνα με τα κριτήρια του ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) για την ανίχνευση του αντιπηκτικού του λύκου θα πρέπει να ισχύει Α παράταση τουλάχιστον μιας δοκιμασίας πήξης εξαρτώμενης από φωσφολιπίδια, όπως LA-sensitive PTT (PTT-LA) και/ή χρόνος πήξης με αραιωμένο Russel viper venom (dRVVT), Διαθέσιμες δοκιμασίες όπως Kaolin Clotting Time (KCT) ή Silica Clotting Time (SCT), Dilute Prothrombin Test (dPT), Platelet Neutralization procedure (PNP), Textarin to ecarin ratio (T/E ratio) είναι επίσης γνωστές. Απαιτούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές δοκιμασίες πήξεως αν και η θετικότητα μίας αρκεί για να καταδείξει την παρουσία του LA Β Απόδειξη της παρουσίας αναστολέα με mixing study, δηλαδή αδυναμία διόρθωσης του παρατεταμένου aPTT μετά από προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος, δηλαδή η μίξη του πλάσματος του ασθενή με το πλάσμα αναφοράς, δε διορθώνει το αποτέλεσμα της παράτασης του χρόνου, Φυσιολογικές τιμές: 31.5-39.5 sec (APTT), ratio=0.8-1.2, διότι εάν η προσθήκη πλάσματος διορθώνει την παράταση υπάρχει άλλο αίτιο, όπως έλλειψη για παράδειγμα κάποιου παράγοντα της πήξης και Γ απόδειξη της εξαρτώμενης από φωσφολιπίδια παρουσίας του αναστολέα, μέσω in vitro διόρθωσης της αναστολής της πήξης με την προσθήκη φωσφολιπιδίων (confirmatory step). Η επιβεβαίωση λαμβάνει θέση με επανάληψη PTT-LA ή dRVVT με περίσσεια φωσφολιπιδίων (hexagonal phase phospholipid). Σε περίπτωση που με την προσθήκη

φωσφολιπιδίων συνεχίζει να υπάρχει παράταση του aPTT λόγος γίνεται για ύπαρξη άλλου ανασταλτή εκτός LAC. Οφείλουμε να αναφερθούμε στην υψηλή αξιοπιστία του εργαστηρίου. Απαιτήσεις ως προς τα αντιδραστήρια ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΛΥΚΟΥ (DRVV SCREEN), Lupus Anticoagulant (DRVV screen), το αντιδραστήριο να είναι από παρασκευάσμα δηλητηρίου οχιάς Russell. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση τουλάχιστον 10 μέρες στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο. ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ ΛΥΚΟΥ (DRVV CONFIRM), Lupus Anticoagulant (DRVV confirm), το αντιδραστήριο να είναι από παρασκευάσμα δηλητηρίου οχιάς Russell πλούσιο σε φωσφολιπίδια. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση τουλάχιστον 10 μέρες στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΜΕΙΞΗΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΩΝ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ, Plasma mixing test for coagulation factor Inhibitors, το υλικό ελέγχου να είναι λυόφιλο ανθρώπινο πλάσμα με κιτρικό από υγιείς δότες.

B2. Κύηση και Λοχεία

Κύηση, ένας ευρύτατος όρος που εκφράζει την φυσιολογική, άμεσα συνδεδεμένη με την συνέχιση του είδους διαδικασία της ανάπτυξης ενός γονιμοποιημένου ωαρίου, εντός ενός θηλυκού οργανισμού μέχρι την γέννηση του. Μία διαδικασία φυσιολογική, όχι μόνο για τον άνθρωπο, αλλά για όλα τα θηλαστικά του ζωικού βασιλείου. Στα πλαίσια της φυσικής επιλογής και εξέλιξης η κύηση είναι μία υπερπηκτική κατάσταση η οποία προφανώς παρείχε πλεονέκτημα επιβίωσης στο θηλυκό θηλαστικό, για τον λόγο αυτό διαιωνίστηκε το πλεονέκτημα αυτό της επιβίωσης μέχρι σήμερα. Στην σύγχρονη εποχή γνωρίζουμε ξεκάθαρα ότι η κύηση είναι μία υπερπηκτική κατάσταση λόγω φυσιολογικών μεταβολών που λαμβάνουν χώρα στον άνθρωπο τουλάχιστον, κατά το δεύτερο και τρίτο τρίμηνο της, οι οποίες συνδέονται με αύξηση του TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolytic Inhibitor), αύξηση των ενεργοποιητών καταστολής του πλασμινογόνου τύπου I και τύπου II (Plasminogen Activator Inhibitor), αύξηση του ινοδωγόνου, αύξηση της αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, αύξηση των παραγόντων II, VII, VIII, X και

μείωση της πρωτεΐνης S⁴². Η μείωση της φυσικής δραστηριότητας, ο καθιστικός τρόπος ζωής, σε συνδυασμό με φυσιολογικές μεταβολές που έλαβαν χώρα, όπως η πίεση της μήτρας στην κάτω κοίλη φλέβα, λόγω αύξησης του μέγεθους της, οδηγεί σε φλεβική στάση στα κάτω άκρα. Οι θρομβοφιλικές αυτές συνιστώσες σε συνδυασμό με την φυσιολογική αύξηση της υπερπηκτικής κατάστασης αυξάνουν περαιτέρω την πιθανότητα εκδήλωσης φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου και σπάνια αρτηριακής θρόμβωσης, σε συχνότητα περίπου 1/1600 κυήσεις^{43,44}. Ενώ ένα ποσοστό κυήσεων περίπου 15% καταλήγει σε αποβολή.⁴⁵ Μετανάλυση προοπτικών μελετών παρουσίας, μετάλλαξης V του Leiden συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο απώλειας εμβρύου αλλά δεν συσχετίζεται με μαιευτικές επιπλοκές, παρόλα αυτά με την πρόοδο της κύησης παρατηρείται αύξηση των εμβρυικών θανάτων σε σχέση με γυναίκες που απουσιάζουν γενετικά εξαρτώμενες θρομβοφιλικές συνιστώσες^{46,47}.

Γ1. Την Υπερομοκυστεϊναιμία

Υπερομοκυστεϊναιμία μία παθολογική κατάσταση που συσχετίζεται με την θρόμβωση. Μπορεί να είναι κληρονομική ή επίκτητη. Κατά την διαδικασία μετατροπής της μεθειονίνης σε κυστεΐνη σχηματίζεται το αμινοξύ ομοκυστεΐνη. Μία ομάδα διαταραχών με ποικίλες βιοχημικές και κατ'επέκταση κλινικές διαφορές που αποδίδονται στην έλλειψη ή στην μειωμένη δραστηριότητα κάποιου ενζύμου ή συνενζύμου που μετέχει στον μεταβολισμό της μεθειονίνης σε κυστεΐνη, με τελικό κοινό καταληκτικό σημείο την ομοκυστεϊναιμία. Η οποία ανάλογα με τα επίπεδα συγκέντρωσης στο πλάσμα ταξινομείται σε Α Ήπιας βαρύτητας (15-30 $\mu\text{mol/l}$). Β Μέτριας βαρύτητας (31-100 $\mu\text{mol/l}$) και Γ Σοβαρής βαρύτητας (> 100 $\mu\text{mol/l}$) Η ομοκυστεΐνη δρα στο ενδοθήλιο αναστέλλοντας την σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου, μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του οποίου οδηγεί σε διαταραχή της αγγειοδιαστολής. In vitro έκθεση λείων μυϊκών κυττάρων σε ομοκυστεΐνη οδηγεί σε πολλαπλασιασμό τους, αυξημένη παραγωγή και εναπόθεση κολλαγόνου. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης προάγουν την σύνθεση ιστικού παράγοντα από τα

μονοκύτταρα μπορεί να οδηγήσουν σε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και παραγωγή θρομβοξάνης A2, αναστολή της έκκρισης προστακυκλίνης καθώς και δόσοεξαρτώμενης αδρανοποίησης in vitro του παράγοντα V έναντι της πρωτεΐνης C (αναστολή της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης C από την θρομβομοντουλίνη), αναστολή του ιστικού τύπου ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Με τον τρόπο αυτό υπάρχει επίδραση στον πηκτικό μηχανισμό. Μικρές αυξήσεις της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα συσχετίζονται με αγγειακή φλεγμονή, αθηροσκληρωτική αγγειακή νόσο και εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση ⁴⁸. Η κληρονομική μορφή ομοκυστεϊναιμίας μεταβιβάζεται με υπολοιπόμενο σωματικό χαρακτήρα με περιγραφή περισσότερων από 90 γονιδιακών μεταλλάξεων. Μεταλλάξεις του γονιδίου της β συνθετάσης της κυσταθειονίνης-CBS (εδράζει στο χρωμόσωμα 21) με συμπαράγοντα την B6, του γονιδίου της συνθετάσης της μεθειονίνης-MS, του γονιδίου της μεθυλενοτερεαυδροφολικής αναγωγάσης-MTHFR (εδράζει στο χρωμόσωμα 1) και Βεταΐνης-ομοκυστεΐνης μεθύλτρανσφεράσης-BHMT που οδηγούν σε υπερομοκυστεϊναιμία. Η επίκτητη μορφή ομοκυστεϊναιμίας έχει να κάνει με διατροφικές ελλείψεις βιταμινών, όπως B6, B12, φυλλικού οξέος που συμπεριφέρονται σαν συνένζυμα και με φάρμακα. Ποσοστό περίπου 6% του γενικού πληθυσμού παρουσιάζει διακυμάνσεις επιπέδων ομοκυστεΐνης πλάσματος από 16-100 μmol/l⁴⁹. Παρά την σαφή συσχέτιση της υπερομοκυστεϊναιμίας με την θρόμβωση, αμφισβητούμενη παραμένει η συσχέτιση της μετάλλαξης του MTHFR με την θρόμβωση ^{50,51}.

Υψηλά επίπεδα παραγόντων

Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι αυξημένα επίπεδα παραγόντων της πήξεως σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για θρόμβωση. Αυξημένα επίπεδα των παραγόντων II, VII, VIII, IX, X, XI, VW και ινωδογόνο είχαν αρχικά συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα φλεβικής θρόμβωσης. Αποτελέσματα της μελέτης Longitudinal

Investigation of Thromboembolism στο σκέλος εκτίμησης της συσχέτισης των αυξημένων επιπέδων παραγόντων πήξεως με τον κίνδυνο θρόμβωσης κατέδειξαν τους παράγοντες VIII και von Willebrand ως ανεξάρτητους δοσοεξαρτώμενους παράγοντες υψηλού κινδύνου για θρομβοεμβολική νόσο. Δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση για τους παράγοντες IX, και XI. Δεν είναι όμως ακόμη ξεκάθαρο εάν οι αυξημένοι παράγοντες είναι από μόνοι τους, αιτία του αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης ή αποτελούν απάντηση σε άλλες αιτίες που προς το παρόν παραμένουν άγνωστες. Επιπρόσθετα για πολλούς από τους παράγοντες δεν είναι ακόμη γνωστό αν οι αυξήσεις οφείλονται σε πολυμορφισμούς του γονιδίου του, ή άλλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, όπως επίσης δεν είναι ξεκάθαρο γιατί κάποιοι παράγοντες σχετίζονται περισσότερο με φλεβική θρόμβωση ενώ κάποιοι άλλοι με αρτηριακή θρόμβωση⁵².

Γ6. Έλλειψη του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου t-PA

Η συγγενής έλλειψη του t-PA είναι σπανιότατη οικογενής διαταραχή. Η επίκτητη έλλειψη συναντάται σε ασθενείς με Νόσο Crohn, ελκώδη κολίτιδα, σακχαρώδη διαβήτη, ασταθή στηθάγχη, οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου.

Γ7. Αύξηση του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1, PAI-1

Η συγγενής διαταραχή του PAI-1 είναι σπανιότατη οικογενής διαταραχή. Η επίκτητη αύξηση συναντάται σε ασθενείς με βαριά αθηρωμάτωση σε σηπτικές καταστάσεις.

III. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

Η εργαστηριακή διερεύνηση της θρομβοφιλίας

Ο έλεγχος θρομβομβοφιλίας πραγματοποιείται με γνώμονα τις οικονομικές πιέσεις που δέχονται τα εκάστοτε συστήματα υγείας, υπηρεσίες υγείας και οργανισμοί έτσι ώστε το αποτέλεσμα του ελέγχου να οδηγήσει σε τροποποίηση της κλινικής

αντιμετώπισης του ασθενούς. Ένα διαγνωστικό εργαλείο που υποστηρίζει αποφάσεις αναφορικά με την επιλογή θεραπείας, τη διάρκεια και την ένταση αυτής, τη δευτερογενή προφύλαξη και την ανάγκη ελέγχου μελών της οικογένειας. Λαμβάνονται υπ' όψιν η ηλικία του ασθενή, το οικογενειακό ιστορικό, ο αριθμός των υποτροπών και η ύπαρξη εκλυτικού παράγοντα. Η σύνοψη των κατευθυντήριων οδηγιών επί του παρόντος έχει ως εξής :

<<Πώς και πότε πρέπει να γίνεται έλεγχος θρομβοφιλίας? Η εργαστηριακή διερεύνηση των αιματολογικών διαταραχών που σχετίζονται με κληρονομική ή επίκτητη θρομβοφιλία περιλαμβάνει: 1. Γενική εξέταση αίματος 2. Μέτρηση του χρόνου προθρομβίνης και του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης 3. Μέτρηση των επιπέδων των φυσιολογικών ανασταλτών της πήξης α. αντιθρομβίνη (AT), β. πρωτεΐνη C (PC), γ. πρωτεΐνη S (PS), 4. Έλεγχο για την παρουσία αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC-resistance) που σχετίζεται με τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden, 5. Έλεγχο για την παρουσία της μετάλλαξης G20210A στο γονίδιο της προθρομβίνης (FII G20210A), 6. Έλεγχο για την παρουσία αντιπηκτικού του λύκου, αντικαρδιολιπινικών αντισωμάτων και αντισωμάτων έναντι της β2 γλυκοπρωτεΐνης I (anti-β2-GP1).

Πότε χρονικά σε σχέση με το θρομβωτικό επεισόδιο πρέπει να γίνονται οι εξετάσεις θρομβοφιλίας? - Ο έλεγχος με μεθόδους PCR για τη μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden ή της μετάλλαξης G20210A στο γονίδιο της προθρομβίνης μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε χρόνο σε σχέση με το θρομβωτικό επεισόδιο και ανεξάρτητα από τη χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής. - Τα επίπεδα των φυσικών ανασταλτών της πήξης ελαττώνονται: • στην οξεία φάση της θρόμβωσης (ελάττωση της PS) • στην κύηση και τη λοχεία (ελάττωση της PS) • στη θεραπεία με οιστρογονικά αντισυλληπτικά (ελάττωση της PS) - Η PC και η PS ελαττώνονται κατά τη θεραπεία με ανταγωνιστές της βιταμίνης K ή όταν υπάρχει έλλειψη της βιταμίνης K που δεν σχετίζεται με θεραπεία με κουμαρινικά. - Η χορήγηση κλασικής ηπαρίνης προκαλεί ελάττωση των επιπέδων της AT. Η ύπαρξη ηπατοπάθειας, μεταξύ των άλλων διαταραχών της πήξης, προκαλεί και ελάττωση των φυσικών ανασταλτών. - Η παρουσία νεφρωσικού συνδρόμου προκαλεί ελάττωση των επιπέδων της AT. - Οι χρονομετρικές μέθοδοι της πήξης επηρεάζονται από τα νεότερα αντιπηκτικά φάρμακα που είναι δραστικά μετά από λήψη από το στόμα και αναστέλλουν εξειδικευμένα τη θρομβίνη

(dabigatran) ή τον παράγοντα Xa (rivaroxaban, apixaban, edoxaban).¹⁶⁻¹⁸ Κατά συνέπεια κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τα φάρμακα αυτά δεν πρέπει να γίνεται μέτρηση των επιπέδων της πρωτεΐνης S και έλεγχος για την παρουσία αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C ή για την παρουσία αντιπηκτικού του λύκου. - Οι ελλείψεις PC και PS πρέπει να διερευνώνται τουλάχιστον 2 μήνες μετά τη διακοπή της αγωγής με ανταγωνιστές της βιταμίνης K. - Η διάγνωση της κληρονομικής έλλειψης της AT, PC ή της PS πρέπει να γίνεται μόνο εφόσον έχουν αποκλειστεί καταστάσεις που οδηγούν σε επίκτητες ελλείψεις τους. - Η εξέταση για το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο μπορεί να γίνει και κατά την οξεία φάση της ΦΘΝ κατά τη διάρκεια της αντιπηκτικής αγωγής με κλασική ηπαρίνη, ηπαρίνη μικρού μοριακού βάρους ή fondaparinux, εφόσον έχει επιλεγθεί κατάλληλη η μέθοδος για τον έλεγχο του αντιπηκτικού του λύκου και έχει σταθμιστεί ως προς την ελάχιστη συγκέντρωση ηπαρίνης ή fondaparinux ή INR, που δεν την επηρεάζει. Συνεπώς, τουλάχιστον σε ασθενείς που λαμβάνουν ανταγωνιστές της βιταμίνης K, ο έλεγχος για το αντιπηκτικό του λύκου πρέπει να γίνεται σε εξειδικευμένο εργαστήριο. - Η εξέταση για ανίχνευση αντιπηκτικού του λύκου, πρέπει να γίνεται με τουλάχιστον δύο μεθόδους, εκ των οποίων η μία να είναι σίγουρα η DRVVT, σύμφωνα με τις Διεθνείς οδηγίες.¹⁹ - Σε γυναίκες με μαιευτικές επιπλοκές (καθ' εξιν αποβολές, προεκλαμψία, ενδομήτριους θανάτους, κ.λπ.) η διερεύνηση για το μαιευτικό αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο είναι προτιμότερο να γίνεται χρονικά κοντά στο επεισόδιο, διότι είναι δυνατόν οι τίτλοι των αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων να πέφτουν όσο απομακρυνόμαστε χρονικά από την κύηση.²⁰

Σε ποιους ασθενείς συστήνεται έλεγχος θρομβοφιλίας Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες.¹¹⁻¹⁵ η εργαστηριακή διερεύνηση για την παρουσία κληρονομικής ή επίκτητης θρομβοφιλίας συστήνεται να γίνεται στις ακόλουθες περιπτώσεις: 1. Σε ασθενείς που το πρώτο επεισόδιο ΦΘΝ συνέβη σε ηλικία μικρότερη των 40 ετών. 2. Σε ασθενείς νεότερους των 60 ετών που παρουσιάζουν το πρώτο επεισόδιο ΦΘΝ χωρίς την παρουσία σημαντικού εκλυτικού παράγοντα κινδύνου ΦΘΝ ή γνωστού ενδογενή παράγοντα κινδύνου για ΦΘΝ. Ο εργαστηριακός έλεγχος θρομβοφιλίας δεν συνιστάται εάν το επεισόδιο ΦΘΝ σχετίζεται με έναν σημαντικό εκλυτικό παράγοντα. 3. Σε ασθενείς με ΦΘΝ που παρουσιάζουν ως μοναδικό παράγοντα κινδύνου ΦΘΝ τη λήψη αντισυλληπτικής αγωγής ή ορμονικής

θεραπείας υποκατάστασης ή εγκυμοσύνη. Ο εργαστηριακός έλεγχος με τεχνικές άλλες από τις μεθόδους μοριακής βιολογίας (PCR), για κληρονομικά αίτια θρομβοφιλίας, θα πρέπει να γίνεται τουλάχιστον δύο μήνες μετά τη διακοπή της ορμονικής θεραπείας ή τον τοκετό. 4. Σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ΦΘΝ ανεξάρτητα από την παρουσία παραγόντων κινδύνου. 5. Σε ασθενείς χωρίς κιρσούς που παρουσιάζουν υποτροπιάζουσα επιτολής θρομβοφλεβίτιδα. 6. Σε ασθενείς με ΦΘΝ σε ασυνήθιστες περιοχές, όπως θρόμβωση της αμφιβληστροειδικής φλέβας ή θρόμβωση εγκεφαλικής, μεσεντέριας ή ηπατικής φλέβας. 7. Σε ασθενείς με επαγόμενη από τη βαρφαρίνη νέκρωση του δέρματος και νεογνά με κεραυνοβόλο πορφύρα (purpura fulminans) που δεν σχετίζεται με σήψη. 8. Σε ασυμπτωματικούς συγγενείς πρώτου βαθμού ασθενών με αποδεδειγμένη συμπτωματική θρομβοφιλία ή με αιματολογική διαταραχή που σχετίζεται με κληρονομική θρομβοφιλία. 9. Σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό μη προκλητής ΦΘΝ σε ηλικία <60 ετών, που πρόκειται να υποβληθούν σε υποβοηθούμενη προσπάθεια με χρήση ορμονικών σκευασμάτων. 10. Σε γυναίκες με ατομικό ιστορικό υποτροπιάζουσών ανεξήγητων αποβολών, υστέρηση ανάπτυξης του εμβρύου ή ενδομήτριο θάνατο. Τα αποτελέσματα του αιματολογικού ελέγχου θρομβοφιλίας πρέπει να ερμηνεύονται από εξειδικευμένο αιματολόγο. Οι ασθενείς με κληρονομική ή επίκτητη θρομβοφιλία πρέπει να παρακολουθούνται από εξειδικευμένο αιματολογικό κέντρο. Δε συνιστάται να γίνεται συστηματικός έλεγχος θρομβοφιλίας σε γυναίκες που πρόκειται να πάρουν αντισυλληπτική αγωγή και σε γυναίκες που πρόκειται να υποβληθούν σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης εφόσον δεν απαντούν σε κανένα από τα προηγούμενα κριτήρια.¹¹⁻¹⁵ >>⁵³

Βασικές αρχές

Η εργαστηριακή διερεύνηση (in vitro), προσπαθεί να μιμηθεί όσο αυτό είναι εφικτό τις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα σε ζώντα οργανισμό (in vivo).

Η έναρξη της εργαστηριακής διερεύνησης ξεκινά με την αιμοληψία ολικού αίματος είτε από αρτηριοκέντηση περιφερικής αρτηρίας είτε από φλεβοκέντηση περιφερικής φλέβας. Το ολικό αίμα συλλέγεται σε προτυποποιημένα φιαλίδια που περιέχουν αντιπηκτικό, με επικρατέστερο εκπρόσωπο το κιτρικό νάτριο 3,2%. Απαραίτητη είναι η τήρηση σχέσης πλήρωσης του φιαλιδίου μεταξύ του όγκου του αντιπηκτικού και του όγκου του συλλεγόμενου ολικού αίματος, στα πλαίσια άμεσης μετά την λήψη, άπαξ πλήρωσης του φιαλιδίου και απουσίας μικροθρόμβων κατά την πλήρωση. Το δείγμα αίματος χρήζει άμεσης φυγοκέντρησης ώστε να διαχωρισθεί το πλάσμα, το οποίο μπορεί να επεξεργασθεί άμεσα ή να φυλαχθεί σε θερμοκρασία μικρότερη των -20 βαθμών της κλίμακας Celcius, για χρονική περίοδο μικρότερη των 30 ημερών και να επεξεργαστεί σε δεύτερο χρόνο μετά από ταχεία απόψυξη και επαναθέρμανση στους 37 βαθμούς Celcius.

Εργαστηριακές μέθοδοι διερεύνησης

A. Πηξιολογικές ή πηκτικές ή χρονομετρικές μέθοδοι. Θεμελιώδης αρχή των μεθόδων αυτών είναι η προσθήκη κάποιας θρομβογόνου ουσίας στο υπό εξέταση πλάσμα και ο υπολογισμός του χρόνου που απαιτείται έως ότου σχηματιστούν τα πρώτα ίχνη ινώδους, στις χειρωνακτικές μεθόδους με επισκόπηση και καταγραφή του χρόνου σχηματισμού του θρόμβου, ενώ στις αυτοματοποιημένες η ανίχνευση γίνεται στους αυτόματους αναλυτές με την μέθοδο της θολωσιμετρίας. Ακολουθεί

σύγκριση του αποτελέσματος με αποτέλεσμα τυποποιημένου παρασκευάσματος με γνωστή λειτουργική δραστηριότητα. Οι μέθοδοι αυτοί βασίζονται είτε στον χρόνο προθρομβίνης (Prothrombin Time – PT), δοκιμασίες με δυνατότητα προσδιορισμού των παραγόντων II,V,VII και X, είτε στον χρόνο ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (Activated Partial Thromboplastin Time - aPTT), δοκιμασίες με δυνατότητα προσδιορισμού των παραγόντων VIII, IX, XI, XII.

A1. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού Prothrombin Time (PT ή Quick Time). Η εδώ και δεκαετίες χορηγούμενη αντιπηκτική αγωγή με ανταγωνιστές της βιταμίνης K, απαιτούσε παρακολούθηση των βιολογικών παραμέτρων και τροποποίηση των χορηγούμενων δόσεων. Η ενεργότητα των παραγόντων πήξης II,V,VII και X της εξωγενούς οδού ή όπως αλλιώς ονομάζεται του συμπλόκου της προθρομβίνης μπορεί γενικά να πραγματοποιηθεί με την βοήθεια του χρόνου προθρομβίνης. Η χρήση διάφορων πρωτοκόλλων και αντιδραστηρίων οδηγεί σε μία μεγάλη μεταβλητότητα αποτελεσμάτων που εκφράζονται σε εκατοστιαίες αναλογίες. Για να μειωθεί η μεταβλητότητα αυτή και τα αποτελέσματα να είναι συγκριτικά ίδια σε διεθνές επίπεδο, συστήθηκε μία συγκριτική τυποποίηση των θρομβοπλαστίνων που χρησιμοποιούνται με θρομβοπλαστίνες αναφοράς που χαρακτηρίζονται από διεθνή δείκτη ευαισθησίας (International Sensivity Index - ISI). Στο μοντέλο προσδιορισμού της τιμής του Διεθνή Δείκτη Ευαισθησίας – ISI μιάς δεδομένης προς διερεύνηση θρομβοπλαστίνης (εξεταζόμενη θρομβοπλαστίνη), προσδιορίζεται ο Χρόνος Προθρομβίνης φυσιολογικού πλάσματος και ο χρόνος προθρομβίνης πλάσματος ασθενή με την δεδομένη θρομβοπλαστίνη και με θρομβοπλαστίνη αναφοράς. Οι χρόνοι που προσδιορίζονται απεικονίζονται σε διάγραμμα log-log με υπολογισμό της εξίσωσης της ευθείας της ορθογώνιας παλινδρόμησης, η κλίση της ευθείας αυτής πολλαπλασιαζόμενη με την τιμή του διεθνή δείκτη ευαισθησίας ISI της θρομβοπλαστίνης αναφοράς, αντιπροσωπεύει την τιμή του διεθνή δείκτη ευαισθησίας, της δεδομένης προς διερεύνηση θρομβοπλαστίνης. Όσο πιο κοντά στην μονάδα είναι η τιμή τόσο πιο αξιόπιστο είναι το εξεταζόμενο δείγμα

θρομβοπλαστίνης, διότι ο χρόνος Quick εκφράζεται σε International Normalized Ratio (INR), η τιμή του οποίου ισούται με το κλάσμα του χρόνου του ασθενούς προς αυτόν του μάρτυρα υψωμένο στην δύναμη ISI της θρομβοπλαστίνης που χρησιμοποιήθηκε. Η μέθοδος του χρόνου προθρομβίνης είναι συγκριτική και βασίζεται στην σύγκριση του χρόνου πήξης του εξεταζόμενου πλάσματος με τον χρόνο ενός φυσιολογικού μάρτυρα αναφοράς, σε ήδη βαθμονομημένο αντιδραστήριο, παρουσία ασβεστούχου θρομβοπλαστίνης.

A2. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (Activated Partial Thromboplastin Time - aPTT). Η μελέτη του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (Activated Partial Thromboplastin Time - aPTT) επιτρέπει την γενική μελέτη της ενεργότητας των παραγόντων II, V, VIII, IX, X, XI, XII και ινωδογόνου. Η δοκιμασία βασίζεται στο χρόνο επαναφοράς του ασβεστίου στο πλάσμα παρουσία ενός αιμοπεταλιακού υποκατάστατου όπως για παράδειγμα κεφαλίνης και μη καθιζήσιμου σωματιδιακού ενεργοποιητή όπως για παράδειγμα πυριτίου. Πυροδότηση τυποποιημένης ενεργοποίησης του παράγοντα XII. Η μέθοδος βασίζεται σε ένα σύστημα όπου όλοι οι πηκτικοί παράγοντες βρίσκονται σε περίσσεια εκτός από τον παράγοντα VIII (Activated Partial Thromboplastin Time - aPTT) ο οποίος προέρχεται μόνο από το προς εξέταση πλάσμα. Κατά την ανάμειξη του εξεταζόμενου πλάσματος με το πλάσμα το οποίο λείπει ο παράγοντας VIII γίνεται μέτρηση του χρόνου πήξης. Με ανάλογο τρόπο γίνεται ο προσδιορισμός των παραγόντων IX, XI, XII^{54,55} .

A3. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού Ινωδογόνου (Fibrinogen). Η μέθοδος βασίζεται στην άμεση συνάρτηση των επιπέδων του ινωδογόνου του πλάσματος με

τον χρόνο πήξης ενός πλάσματος υπερκερασμένου σε θρομβίνη και διαλυμένου σε κατάλληλες αναλογίες.

A4. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του παράγοντα II. Η μέθοδος βασίζεται στην δημιουργία ενός συστήματος όπου όλοι οι παράγοντες βρίσκονται σε περίσσεια, εκτός από τον παράγοντα προς διερεύνηση, στην συγκεκριμένη περίπτωση του παράγοντα II, ο οποίος προέρχεται από το προς εξέταση πλάσμα. Η ανάμειξη του εξεταζόμενου πλάσματος με το πλάσμα το οποίο απουσιάζει ο παράγοντας II γίνεται παρουσία νεοπλαστικής και η μέτρηση του χρόνου πήξεως οδηγεί σε προσδιορισμό των επιπέδων του παράγοντα II. Με ανάλογο τρόπο προσδιορίζονται οι παράγοντες V, VII, X⁵⁶.

A5. Πηκτική μέθοδος προσδιορισμού του αντιπηκτικού του λύκου. Η μέθοδος βασίζεται στην ιδιότητα της ετερογενούς αυτής ομάδας αντισωμάτων, τα οποία στρέφονται κατά πρωτεϊνών του πλάσματος που συνδέονται με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, να παρατείνουν *in vitro* τις συνήθεις εργαστηριακές πηξιολογικές μεθόδους που εξαρτώνται από τα φωσφολιπίδια, όπως για παράδειγμα παράταση του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστικής (aPTT). Συνήθως τα αντισώματα αυτά είναι της τάξεως IgG ή IgM ή συνδυασμός αυτών. Στα πλαίσια ελαχιστοποίησης τεχνικού λάθους συνιστάται διπλή φυγοκέντρωση του πλάσματος ιδιαίτερα για τις εξαρτώμενες από τα αιμοπετάλια πηξιολογικές μεθόδους, όπου τα εναπομείνοντα αιμοπετάλια μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα ειδικά μετά από κατάψυξη και απόψυξη του πλάσματος. Όπως και ταχεία κατάψυξη του πλάσματος στους -70o Celcius, με απόψυξη στους +37o Celcius εφόσον η εξέταση πραγματοποιηθεί σε δεύτερο χρόνο. Δεν συνιστάται επαναψύξη του πλάσματος.

Πιστοποιημένα εργαστήρια που τηρούν τα διεθνή πρότυπα σύμφωνα με τα κριτήρια του ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) για την ανίχνευση του αντιπηκτικού του λύκου θα πρέπει να χρησιμοποιούν δύο τυποποιημένες μεθόδους διαφορετικής μεταξύ τους αρχής ακολουθώντας τα εξής διαγνωστικά βήματα – κριτήρια. Οφείλει να ισχύει

A παράταση τουλάχιστον μιας δοκιμασίας πήξης εξαρτώμενης από φωσφολιπίδια, όπως LA-sensitive PTT (PTT-LA) και/ή χρόνος πήξης με αραιωμένο Russel viper venom (dRVVT). Διαθέσιμες δοκιμασίες όπως Kaolin Clotting Time (KCT) ή Silica Clotting Time (SCT), Dilute Prothrombin Test (dPT), Platelet Neutralization procedure (PNP), Textarin to ecarin ratio (T/E ratio) είναι επίσης γνωστές. Απαιτούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές δοκιμασίες πήξεως αν και η θετικότητα μίας αρκεί για να καταδείξει την παρουσία του LA (Lupus Anticoagulant). Αν οι τιμές του χρόνου προθρομβίνης (Prothrombin Time – PT), του χρόνου ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated Partial Thromboplastin Time aPTT) και/ή χρόνος πήξης με αραιωμένο Russel viper venom (dRVVT) για παράδειγμα, είναι φυσιολογικές σε σχέση με τις τοπικές cut-off τιμές, που προκύπτουν από την τιμή πάνω από την 99η εκατοστιαία θέση των υγιών δοτών (έλεγχος σε πλάσμα από 40 υγιείς δότες με ένα προς ένα [1/1] ανάμειξη με το φυσιολογικό παρασκεύασμα πλάσματος [Pooled Normal Plasma PNP] χωρίς προηγούμενη επώαση) και όχι χρήση cut-off ορίων άλλων εργαστηρίων, το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό για ύπαρξη αντιπηκτικού του λύκου και δεν συντρέχει λόγος περαιτέρω διερεύνησης⁵⁷. Η cut-off τιμή θα προκύψει από την μεγαλύτερη από την 99η εκατοστιαία θέση της διακύμανσης των φυσιολογικών δοτών. Εναλλακτικά μπορεί να προκύψει από τον Δείκτη του Κυκλοφορούντος Αντιπηκτικού (Index of Circulating Anticoagulant – ICA) με την χρήση ειδικού τύπου⁵⁷.

B Ανιχνεύοντας παράταση στο PT, aPTT ή στον χρόνο πήξης με αραιωμένο Russel viper venom (dRVVT) για παράδειγμα, θα προχωρήσουμε στην απόδειξη της παρουσίας αναστολέα με mixing study, δηλαδή αδυναμία διόρθωσης του παρατεταμένου aPTT μετά από προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος, δηλαδή η μίξη του πλάσματος του ασθενή με το πλάσμα αναφοράς, δε διορθώνει το αποτέλεσμα της παράτασης του χρόνου⁵⁷. Ορθολογικό στην φάση αυτή να γίνει και εξέταση χρόνου

θρομβίνης (Thrombin Time – TT), παράταση του οποίου θα πρέπει να μας οδηγήσει και σε προσδιορισμό χρόνου ρεπτιλάσης (RT)⁵⁷. Η ρεπτιλάση ενζύμο από το φίδι *bothrops atrox* που έχει την ικανότητα να αποκόπτει το ινωπεπτίδιο Α από το ινωδογόνο, δρα περίπου σαν θρομβίνη, δεν επηρεάζεται όμως από την παρουσία ηπαρίνης. Επομένως παρατεταμένος χρόνος TT και φυσιολογικού RT αποτελεί ένδειξη ηπαρίνης, ιρουδίνης ή αντιθρομβίνης άνοσης αιτιολογίας στο αίμα. Φυσιολογικές τιμές είναι : 31.5-39.5 sec (APTT), ratio=0.8-1.2. Εάν όμως η προσθήκη πλάσματος διορθώνει την παράταση υπάρχει άλλο αίτιο, όπως έλλειψη για παράδειγμα κάποιου παράγοντα της πήξης. Το φυσιολογικό παρασκεύασμα πλάσματος (Pooled Normal Plasma PNP) που προστίθεται είναι έτοιμο εμπορικό λυόφιλο ή κατεψυγμένο προϊόν που παρασκευάζεται με τρόπο τέτοιο ώστε να μην υπάρχουν εναπομείνοντα αιμοπετάλια και οι παράγοντες της πήξης που περιέχει να προσεγγίζουν το 100% της λειτουργικότητας τους, διατηρείται δε σε βαθιά κατάψυξη στους -70o Celcius, σε μικρά μιάς χρήσης σωληνάρια (Aliquots) που δεν χρήζουν επαναψύξης⁵⁷. Επί προσδιορισμού παρατεταμένου χρόνου πήξης (clotting time) σε σχέση με το cut-off όριο του εργαστηρίου ή όταν το ICA είναι μεγαλύτερο από το τοπικό cut-off όριο ή όταν κατά την μίξη δεν υπάρχει διόρθωση του χρόνου πήξης (προϋπόθεση η απουσία ηπαρίνης στο εξετασθέν δείγμα, δηλαδή φυσιολογικός χρόνος θρομβίνης TT) ή dRVVT mix ratio >1,2 υπάρχει ένδειξη παρουσίας αντιπηκτικού του λύκου και συνέχισης της δοκιμασίας απόδειξης ότι ο αναστολέας αυτός στρέφεται κατά των φωσφολιπιδίων⁵⁷.

Γ απόδειξη της εξαρτώμενης από φωσφολιπίδια παρουσίας του αναστολέα, μέσω *in vitro* διόρθωσης της αναστολής της πήξης με την προσθήκη φωσφολιπιδίων (confirmatory step)⁵⁷. Η επιβεβαίωση λαμβάνει θέση με επανάληψη PTT-LA ή dRVVT με περίσσεια φωσφολιπιδίων (hexagonal phase phospholipid). Στην φάση αυτή γίνεται αύξηση της συγκέντρωσης των φωσφολιπιδίων στα παρατεταμένα τεστ, με χρήση φωσφολιπιδίων διπλής στοιβάδας ή εξαγωνικών φωσφολιπιδίων που δεν έχουν ψυχθεί⁵⁷. Ο έλεγχος γίνεται σε πλάσμα 40 υγιών δοτών με χαμηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων (έλεγχος - Screen) καθώς και σε πλάσμα με υψηλή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων (επιβεβαιωτική Confirm)⁵⁷. Το cut-off οριο αντιστοιχεί στην μέση επί τοις εκατό εξατομικευμένη διόρθωση που προσδιορίζεται από τον τύπο

Μέση επί τοις εκατό διόρθωση = (τιμή Screen – τιμή Confirm/ τιμή Screen) x %.

Όταν η Μέση επί τοις εκατό διόρθωση είναι μεγαλύτερη από την τοπική cut-off τιμή-όριο το αποτέλεσμα θεωρείται επιβεβαιωτικό για την παρουσία αντιπηκτικού του λύκου⁵⁷. Σε περίπτωση που με την προσθήκη φωσφολιπιδίων συνεχίζει να υπάρχει παράταση του aPTT λόγος γίνεται για ύπαρξη άλλου ανασταλτή εκτός LAC. Οφείλουμε να αναφερθούμε στην υψηλή αξιοπιστία του εργαστηρίου. Απαιτήσεις ως προς τα αντιδραστήρια ANTIPIHKTIKA ΛΥΚΟΥ (DRVV SCREEN), Lupus Anticoagulant (DRVV screen), το αντιδραστήριο να είναι από παρασκευάσμα δηλητηρίου οχιάς Russell. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση τουλάχιστον 10 μέρες στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο. ANTIPIHKTIKA ΛΥΚΟΥ (DRVV CONFIRM), Lupus Anticoagulant (DRVV confirm), το αντιδραστήριο να είναι από παρασκευάσμα δηλητηρίου οχιάς Russell πλούσιο σε φωσφολιπίδια. Σταθερότητα μετά την ανασύσταση τουλάχιστον 10 μέρες στους 2-8°C στο αρχικό φιαλίδιο. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΜΕΙΞΗΣ ΓΙΑ ΕΛΕΓΧΟ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΩΝ ΤΗΣ ΠΗΞΗΣ, Plasma mixing test for coagulation factor Inhibitors, το υλικό ελέγχου να είναι λυόφιλο ανθρώπινο πλάσμα με κιτρικό από υγιείς δότες.

B. Χρωμογόνες ή χρωματομετρικές μέθοδοι. Βασική αρχή των μεθόδων αυτών αποτελεί η ύπαρξη και χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τεχνητά κατασκευασμένων στα πλαίσια τεχνικής σύνθεσης ολιγοπεπτιδίων που μιμούνται το φυσιολογικό υπόστρωμα γνωστού ενζύμου, του οποίου προσδιορίζεται η δραστηριότητα. Η συνήθης σύνθεση περιλαμβάνει 3 με 5 συνθετικά αμινοξέα προστατευόμενα από ειδική ομάδα προστασίας PG (Protecting Group), στο αμινοτελικό άκρο, ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο του πεπτιδίου συνδέεται ένα φθοριόχρωμα ή μία χρωμογόνος ουσία η οποία αποσπάται κατά την τέλεση της αντίδρασης με το υπό διερεύνηση πλάσμα και τον σχηματισμό φθορισμού ή χρώματος, η μέτρηση των οποίων γίνεται με φάσμα - φώτο – μετρία. Το αποτέλεσμα ανάγεται επί τοις εκατό και αντιστοιχεί στην δραστηριότητα του ενζύμου.

B1. Χρωμογόνα μέθοδος προσδιορισμού Αντιθρομβίνης (ATIII) Για αποφυγή σύγχυσης αξίζει να αναφερθεί, ότι ο όρος Αντιθρομβίνη III, καθιερώθηκε διεθνώς το 1993 όταν αποδείχθηκε ότι πολλές αντιθρομβίνες που είχαν αναφερθεί και ταξινομηθεί με λατινικούς χαρακτήρες από το I έως το V, μέχρι τα μέσα του 20ου αιώνα αντιστοιχούσαν στην δράση του μορίου της αντιθρομβίνης III⁵⁸. Η αναστολή της δράσης των πρωτεασών από την Αντιθρομβίνη III, στις αντιδράσεις της πήξης γίνεται με τον σχηματισμό συμπλέγματος ένα προς ένα. Δηλαδή ενεργό ενζύμο και αντιθρομβίνη --> αδρανικοποιημένο ενζύμο και αντιθρομβίνη 1/1. Σε αυτήν την άμεση ανασταλτική δράση 1/1, αδρανικοποίησης του ενζύμου από την αντιθρομβίνη III βασίζεται η μέθοδος προσδιορισμού. Τέτοιες πρωτεάσες για παράδειγμα μπορεί να είναι ο ενεργοποιημένος παράγοντας IX (FIXa), ο ενεργοποιημένος παράγοντας X (FXa), η θρομβίνη (FIIa). Η αντίδραση αντιθρομβίνης III πρωτεολυτικού ενζύμου η οποία είναι αργή καταλύεται παρουσία ηπαρίνης, έτσι ώστε η ταχύτητα αδρανικοποίησης του αντιπηκτικού ενζύμου από την αντιθρομβίνη III να αυξάνει κατά περίπου 1000 φορές^{59,60}. Ακόμα και παρουσία ηπαρίνης η 1/1 αντίδραση ενζύμου αντιθρομβίνης δεν διαφοροποιείται. Δηλαδή ένα μόριο αντιθρομβίνης αναστέλει ένα μόριο ενζύμου. Το σύμπλεγμα όμως αντιθρομβίνης – ηπαρίνης επιδρά σε όλα τα επίπεδα της πήξης και δύναται να αναστείλει 1. την Θρομβίνη (FIIa) 2. Την Προθρομβινάση (Factor Xa, γνωστός και ως Stuart – Prower activated factor) 3. Την Δεκάση II (Factor IXa) 4. Την ενεργοποίηση του συστήματος επαφής (Υψηλού Μοριακού Βάρους Κινογόνα/κινίνες - High Molecular Weight Kininogens [HMWK], Καλλικρεΐνη – Kallikrein [KK], τον ενεργοποιημένο παράγοντα XI – Factor XI activated [FXIa], τον ενεργοποιημένο παράγοντα XII - Factor XII activated [FXIIa] ή αλλιώς γνωστό και ως ενεργοποιημένο παράγοντα του Hageman) 5. Την ενεργοποίηση του παράγοντα XIII ή αλλιώς γνωστό και ως παράγοντα Laki-Lorand [Factor Laki – Lorand] και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. 6. Είναι επίσης γνωστή η αναστολή του ενεργοποιημένου παράγοντα VII (FVIIa) in vitro. Ο κύριος φυσιολογικός αναστολέας του οποίου είναι ο Αναστολέας της Οδού του Παράγοντα Ιστών – Tissue Factor Pathway Inhibitor [TFPI], αν όμως σχηματισθεί σύμπλεγμα του παράγοντα VIIa με τον παράγοντα III ή Ιστικό Παράγοντα – Tissue Factor (Factor III – FIII) τότε αναστέλλεται από το σύμπλεγμα Αντιθρομβίνης-Ηπαρίνης^{61,62}. Η έντονη ανασταλτική δράση της αντιθρομβίνης στην θρομβίνη παρουσία ηπαρίνης καθώς και η άμεση ανασταλτική δράση της αντιθρομβίνης στην

θρομβίνη βρίσκονται στη βάση της αρχής μεθόδου προσδιορισμού της Αντιθρομβίνης με την μέθοδο Χρωμογόνων Υποστρωμάτων. Στην πρώτη φάση της μεθόδου αυτής το εξεταζόμενο πλάσμα επωάζεται σε περίσσεια ηπαρίνης με μία γνωστή ποσότητα θρομβίνης, κατά συνέπεια η μέθοδος αυτή δεν επηρεάζεται από θεραπευτικά επίπεδα ηπαρίνης. Στην δεύτερη φάση γίνεται μέτρηση της υπολειμματικής δράσης της θρομβίνης σε συνθετικό χρωμογόνο υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα το CBS 61.50 λόγω της αμιδολυτικής της δράσης και της ικανότητας να διασπά την Ριβονουκλεάση η οποία και μετράται στα 405nm (νανόμετρα). Γνωρίζοντας την 1/1 αντίδραση Αντιθρομβίνης /Πρωτεολυτικού ενζύμου, στην προκειμένη περίπτωση Θρομβίνης, είναι ξεκάθαρο ότι η ποσότητα της θρομβίνης που εξουδετερώθηκε στην πρώτη φάση της μεθόδου είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας της αντιθρομβίνης του προς εξέταση πλάσματος. Η υπολειπόμενη ποσότητα θρομβίνης που μετράται στο δεύτερο στάδιο από την απελευθέρωση των RNA, είναι αντιστρόφως ανάλογη των επιπέδων της αντιθρομβίνης του εξεταζόμενου δείγματος.

B2. Χρωμογόνα μέθοδος προσδιορισμού πρωτεΐνης C (Protein C – PC) Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνητή ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C του προς εξέταση πλάσματος. Με την βοήθεια ειδικού ενεργοποιητή, όπως για παράδειγμα του Angistrodon C, η πρωτεΐνη C του εξεταζόμενου πλάσματος μετατρέπεται σε ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C, η αμιδολυτική ικανότητα της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C πάνω σε χρωμογόνο υπόστρωμα, όπως για παράδειγμα CBS 42.46 οδηγεί στην απελευθέρωση RNA το οποίο RNA μπορεί να μετρηθεί στα 405nm (νανόμετρα). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης C στο προς εξέταση πλάσμα είναι ευθέως ανάλογα της έντασης του παραγόμενου χρώματος.

Γ. Ανοσολογικές μέθοδοι. Στην βάση των μεθόδων αυτών είναι η γνωστή αντίδραση αντιγόνου αντισώματος, στην προκειμένη περίπτωση ο προς μέτρηση παράγοντας ή ουσία. Σε γνωστά αριθμημένα πάνελ υπάρχει επιλεκτική απουσία κάποιου αντισώματος από το σύνολο των εξεταζομένων αντισωμάτων, κατά συνέπεια μη τέλεση της συγκεκριμένης αντίδρασης σηματοδοτεί την απουσία της προς αναζήτηση ουσίας ή παράγοντα. Ακολουθεί επιβεβαίωση με μονό μαρκάρισμα του προς διερεύνηση πλάσματος ως προς το απών αντιγόνο. Μέθοδοι με ευρεία διάδοση είναι οι ανοσοενζυμικές γνωστές και ως ELISA, ανοσοηλεκτροφόρησης, ανοσοδιάχυσης, ανοσοθολοσιμμετρίας και άλλες. Η αξιοπιστία της μεθόδου εξαρτάται από το είδος/τύπος της επιφάνειας του πλακιδίου (microplate) που χρησιμοποιείται, από την πηγή και την ποιότητα των αντισωμάτων, από τους βαθμονομητές (calibrators) και τις cut-off τιμές⁵⁷.

Γ1. Ανοσοθολοσιμμετρική μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερης πρωτεΐνης C. Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνητή παραγωγή ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ελεύθερης πρωτεΐνης C, αντισώματα τα οποία προσκολλούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε διαμορφωμένη επιφάνεια μικροσφαιριδίων latex. Προσθήκη τυποποιημένης (συγκεκριμένης) ποσότητας από το εξεταζόμενο πλάσμα, προκαλεί αντίδραση αντισώματος – αντιγόνου στην προκειμένη περίπτωση αντισώματος – ελεύθερης πρωτεΐνης C με τελικό αποτέλεσμα την συγκόλληση των μικροσωματιδίων latex και κατ' επέκταση αύξηση της θολερότητας του εναιωρήματος. Η αύξηση της θολερότητας του εναιωρήματος κατά ακολουθία οδηγεί στην αύξηση της απορροφητικότητας του μέσου που μετριέται με τη φωτομετρική μέθοδο. Τα παραγώμενα συσσωματώματα έχουν πολύ μεγαλύτερη διάμετρο από το μήκος κύματος του φωτός, όσο μεγαλύτερα είναι τα συσσωματώματα τόσο περισσότερο φως απορροφάται και αντίστροφα τα μικροσφαιρίδια latex έχουν διάμετρο πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος του φωτός και το φως απορροφάται πολύ λίγο. Η διακύμανση της αύξησης εξαρτάται από την ποσότητα της ελεύθερης πρωτεΐνης C στο εξεταζόμενο πλάσμα.

Γ2. Ανοσοθολοσυμμετρική μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερης πρωτεΐνης S. Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνητή παραγωγή ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της ελεύθερης πρωτεΐνης S, αντισώματα τα οποία προσκολλούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε διαμορφωμένη επιφάνεια μικροσφαιριδίων latex. Προσθήκη τυποποιημένης (συγκεκριμένης) ποσότητας από το εξεταζόμενο πλάσμα, προκαλεί αντίδραση αντισώματος – αντιγόνου στην προκειμένη περίπτωση αντισώματος – ελεύθερης πρωτεΐνης S με τελικό αποτέλεσμα την συγκόλληση των μικροσωματιδίων latex και κατ' επέκταση αύξηση της θολερότητας του εναιωρήματος. Η αύξηση της θολερότητας του εναιωρήματος κατά ακολουθία οδηγεί στην αύξηση της απορροφητικότητας του μέσου που μετριέται με τη φωτομετρική μέθοδο. Τα παραγώμενα συσσωματώματα έχουν πολύ μεγαλύτερη διάμετρο από το μήκος κύματος του φωτός, όσο μεγαλύτερα είναι τα συσσωματώματα τόσο περισσότερο φως απορροφάται και αντίστροφα τα μικροσφαιρίδια latex έχουν διάμετρο πολύ μικρότερη από το μήκος κύματος του φωτός και το φως απορροφάται πολύ λίγο. Η διακύμανση της αύξησης εξαρτάται από την ποσότητα της ελεύθερης πρωτεΐνης S στο εξεταζόμενο πλάσμα.

Γ3. Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA) του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου 1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 – PAI-1) Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνητή κατασκευή ανθρώπινων μονόκλωνων άντι PAI-1 αντισωμάτων. Γνωρίζουμε ότι ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου – 1, συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ από τα αιμοπετάλια απελευθερώνεται σε ανενεργή μορφή. Είναι παρών στο πλάσμα τόσο σε ενεργή όσο και σε ανενεργή μορφή, συνδεδεμένος σε σύμπλεγμα ή όχι με τον Ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (Tissue Plasminogen Activator - tPA), ενώ το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται στο καρβόξυ τελικό άκρο του. Μπορεί και σταθεροποιείται από την βιτρονεκτίνη ο αιμοπεταλιακός αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Σε πλαστικό υπόστρωμα επικαλυμένο με ανθρώπινο μονόκλωνο αντίσωμα έναντι του αναστολέα του ενεργοποιητή του

πλασμινογόνου, καθιλώνεται ο PAI-1 του προς εξέταση πλάσματος. Ενώ με την βοήθεια μονόκλωνου αντισώματος επισημασμένου με υπεροξυδάση που προσκολλάται σε διαφορετικό αντιγονικό υποδοχέα, απομακρυσμένο από τον πρώτο υποδοχέα, διακρίνεται ο σταθεροποιημένος από την βιτρονεκτίνη PAI-1. Υπολογίζεται από την ενεργότητα της, το ποσοστό της συνδεδεμένης υπεροξυδάσης σε υπόστρωμα ορθοφαινυλενοδιαμίνης παρουσία οξυγονούχου ύδατος. Μετά την διακοπή της αντίδρασης με ισχυρό οξύ, η ένταση της χρώσης του διαλύματος σχετίζεται ποσοτικά με την αρχική συγκέντρωση του PAI-1 στο προς εξέταση πλάσμα.

Γ4. Ανοσοενζυμική μέθοδος προσδιορισμού (ELISA) του ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (tissue Plasminogen Activator tPA) Η μέθοδος βασίζεται στην τεχνητή κατασκευή ανθρώπινων μονόκλωνων άντι tPA αντισωμάτων. Σε πλαστικό υπόστρωμα επικαλυμένο με ανθρώπινο μονόκλωνο αντίσωμα έναντι του Ιστικού ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, καθιλώνεται ο tPA του προς εξέταση πλάσματος. Ενώ με την βοήθεια μονόκλωνου αντισώματος επισημασμένου με υπεροξυδάση που προσκολλάται σε διαφορετικό αντιγονικό υποδοχέα, απομακρυσμένο από τον πρώτο υποδοχέα, διακρίνεται ο σταθεροποιημένος tPA. Υπολογίζεται από την ενεργότητα της υπεροξυδάσης, το ποσοστό της συνδεδεμένης υπεροξυδάσης σε υπόστρωμα ορθοφαινυλενοδιαμίνης παρουσία οξυγονούχου ύδατος. Μετά την διακοπή της αντίδρασης με ισχυρό οξύ, η ένταση της χρώσης του διαλύματος σχετίζεται ποσοτικά με την αρχική συγκέντρωση του tPA στο προς εξέταση πλάσμα.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λαμβάνοντας υπ'όψιν τις οικονομικές πιέσεις που δέχονται τα συστήματα υγείας, επίσημοι οργανισμοί συντάσσουν και εκδίδουν κατευθυντήριες οδηγίες ελέγχου θρομβοφιλίας. Η κατηγοριοποίηση των ασθενών για έλεγχο γίνεται με κριτήρια που στοχεύουν στην ανάδειξη αποτελεσμάτων που μπορούν να αλλάξουν την ροή του νοσήματος και την κλινική αντιμετώπιση του ασθενούς. Τα διαγνωστικά εργαλεία υποστηρίζουν αποφάσεις αναφορικά με την επιλογή θεραπείας, την διάρκεια και την ένταση τής, την δευτερογενή προφύλαξη, την παραπομπή μελών της οικογένειας για έλεγχο. Στο σύνολο των διαγνωστικών εργαλείων αξιολογούμε το ιστορικό του ασθενούς, την παρούσα κλινική εικόνα του και τα εργαστηριακά ευρήματα. Θεμέλιο λίθο αποτελεί η ύπαρξη ή όχι θρομβοεμβολικού συμβάματος. Η φλεβική θρόμβωση είναι χρόνια νόσημα και συνοδεύεται από υποτροπές. Η αρχική εντόπιση μπορεί να επηρεάσει τον κίνδυνο υποτροπής και αντίστροφα, η υποτροπή είναι συνηθέστερη στην θέση της αρχικής εντόπισης. Για παράδειγμα ο κίνδυνος υποτροπής σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση ανώθεν της ιγνυακής και ειδικά με λαγονομηριαία εντόπιση είναι μεγαλύτερος σε σχέση με ασθενείς όπου το επεισόδιο εντοπίστηκε κάτωθεν της ιγνυακής⁶³. Προδιαθεσικοί παράγοντες κινδύνου επηρεάζουν σημαντικά την πορεία του νοσήματος, για παράδειγμα ασθενής με ιδιοπαθές επεισόδιο θρόμβωσης ή αγνώστου αιτιολογίας έχει μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με ασθενή με δευτεροπαθή φλεβοθρόμβωση όπως κύηση και λοχεία, λήψη αντισυλληπτικών, τραυματισμοί, κατάγματα, χειρουργικές επεμβάσεις⁶⁴. Ο χρόνος που μεσολάβησε από το αρχικό θρομβοεμβολικό συμβάν, για παράδειγμα για την πρώτη εβδομάδα είναι περίπου 1,5%, για τον πρώτο μήνα περίπου 5%, ενώ για το πρώτο έτος το ποσοστό είναι περίπου 12%, στην δεκαετία περίπου 30%, σαφώς με την πάροδο του χρόνου μειώνεται αλλά δεν μηδενίζεται⁶⁵. Ένα σύνολο θρομβοφιλικών συνιστώσων σαφώς αυξάνει την πιθανότητα εκδήλωσης

θρομβοεμβολικού συμβάντος, η εμφάνιση του θρομβοεμβολικού συμβάντος συνδέεται πάντα με κάποιον πυροδοτικό μηχανισμό που διαταράσσει την ισορροπία της πηκτικότητας είτε προς την πλευρά της παθολογικής πηκτικότητας που οδηγεί κλινικά σε θρόμβωση, ενώ αναλογικά η λειτουργία του ινωδολυτικού μηχανισμού διαταράσσει την ισορροπία της ινωδόλυσης μείωση της οποίας οδηγεί σε θρόμβωση, καθώς επίσης και συνδυασμένες διαταραχές αύξησης της παθολογικής πηκτικότητας και ελάττωσης της ινωδόλυσης.

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <https://www.britannica.com/biography/Rudolf-Virchow>
2. *Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. Thromb Diath Haemorrh. 1965; 13:516-530.*
3. *Thrombophilia, risk factors and prevention. Campello E, Spiezia L, Adamo A, Simioni P. Expert Rev Hematol.2019 Mar;12(3):147-158, doi:10.1080/17474086.2019.1583555.Epub 2019 Feb 26.*
4. *Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. Lancet. 1999; 353:1167-1173.*
5. *Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. Ann Intern Med. 2003; 138:128-134*
6. *Martinelli I, Mannucci PM, De Stefano V, et al. Different risks of thrombosis in four coagulation defects associated with inherited thrombophilia: a study of 150 families. Blood. 1998; 92:2353-2358.*
7. *Factor V leiden and activated protein C resistance Author: Kenneth A Bauer, MD Section Editor: Lawrence LK Leung. MD, Deputy Editor: Jennifer S Tirnauer, MD*
8. *Dahlback B, Hildebrand B, Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. Proc Natl Acad Sce U S A. 1994; 91:1396-1400*

9. *Rees DC, Cox M, Clegg JB. World distribution of factor V Leiden. Lancet. 1995; 346:1133-1134*
10. *Lee DH, Henderson PA, Blajchman MA. Prevalence of factor V Leiden in a Canadian blood donor population. CMAJ. 1996; 155:285-289*
11. *Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, et al. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood. 1996; 88:3698-3703*
12. *Rosendaal FR, Doggen CJ, Zivelin A, et al. Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant. Thromb Haemost. 1998; 79:706-708*
13. *Koster T, Rosendaal FR, Briët E, et al. Protein C deficiency in a controlled series of unselected outpatients: an infrequent but clear risk factor for venous thrombosis (Leiden Thrombophilia Study). Blood. 1995; 85:2756-2761*
14. *Emmerich J, Rosendaal FR, Cattaneo M, et al. Combined effect of factor V Leiden and prothrombin 20210A on the risk of venous thromboembolism--pooled analysis of 8 casecontrol studies including 2310 cases and 3204 controls. Study Group for Pooled-Analysis in Venous Thromboembolism. Thromb Haemost. 2001; 86:809-816*
15. *Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for the human prothrombin. Biochemistry. 1987; 26:6165-6177*
16. *Miljić P, Heylen E, Willemse J, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): a molecular link between coagulation and fibrinolysis. Srp Arh Celok Lek. 2010; 138:74-78*
17. *Smirnov MD, Safa O, Esmon NL, et al. Inhibition of activated protein C anticoagulant activity by prothrombin. Blood. 1999; 94:3839-3846*
18. *Prothrombin G20210A Author: Kenneth A Bauer, MD Section Editor: Lawrence LK Leung, MD, Deputy Editor: Jennifer S Tirnauer, MD*
19. *Odegård OR, Abildgaard U. Antithrombin III: critical review of assay methods. Significance of variations in health and disease. Haemostasis. 1978; 7:127-134*
20. *Tait RC, Walker ID, Perry DJ, et al. Prevalence of antithrombin deficiency in the healthy population. Br J Haematol. 1994; 87:106-112*
21. *Thaler E, Lechner K. Antithrombin III deficiency and thromboembolism. Clin Haematol. 1981; 10:369-390*
22. *Demers C, Ginsberg JS, Hirsh J, et al. Thrombosis in antithrombin-III-deficient persons. Report of a large kindred and literature review. Ann Intern Med. 1992; 116:754-761*
23. *Lane DA, Bayston T, Olds RJ, et al. Antithrombin mutation database: 2nd (1997) update. For the Plasma Coagulation Inhibitors Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost. 1997; 77:197-211*

24. *VGriffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, et al. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. J Clin Invest. 1981; 68:1370-1373*
25. *Aiach M, Gandrille S, Emmerich J. A review of mutations causing deficiencies of antithrombin, protein C and protein S. Thromb Haemost. 1995; 74:88-89*
26. *Mustafa S, Mannhalter C, Rintelen C, et al. Clinical features of thrombophilia in families with gene defects in protein C or protein S combined with factor V Leiden. Blood Coagul Fibrinol. 1998; 9:85-89*
27. *Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. Nature. 1994; 369:64-67*
28. *Dykes AC, Walker ID, McMahon AD, et al. A study of Protein S antigen levels in 3788 healthy volunteers: influence of age, sex and hormone use, and estimate for prevalence of deficiency state. Br J Haematol*
29. *Lijfering WM, Mulder R, ten Kate MK, et al. Clinical relevance of decreased free protein S levels: results from a retrospective family cohort study involving 1143 relatives. Blood. 2009; 113:1225-1230*
30. *Esmon CT. The protein C anticoagulant pathway. Arterioscl Thromb. 1992; 12:135-145*
31. *Heeb MJ, Rosing J, Bakker HM. Protein S binds to and inhibit factor Xa. Proc Natl Acad Sci. 1994; 91:2728-2732*
32. *Congenital fibrinogen disorders: an update. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 39 (6): 585–95. 2013*
33. *The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. Journal of Thrombosis and Haemostasis 4 (10): 2115–29. 2006*
34. *Cryofibrinogenemia. Journal of Clinical Rheumatology 19 (3): 142–8. 2013*
35. *The effects of fibrinogen levels on thromboelastometric variables in the presence of thrombocytopenia. Anesthesia and Analgesia 108 (3): 751–8. March 2009*
36. *Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost. 2006; 4:295-306*
37. *Hashimoto Y, Kawamura M, Ichikawa K, et al. Anticardiolipin antibodies in NZW x BXSB F1 mice: a model of antiphospholipid syndrome. J Immunol. 1992; 149:1063-1068*
38. *De Laat B, Derksen RH, Urbanus RT, de Groot PG. IgG antibodies that recognize epitope Gly40-Arg43 in domain I of beta 2-glycoprotein I cause LAC, and their presence correlates strongly with thrombosis. Blood. 2005; 105:1540-1545*
39. *Fischetti F, Durigutto P, Pellis V, et al. Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. Blood. 2005; 106:2340-2346*

40. Arad A, Proulle V, Furie RA, Furie BC, Furie B. β (2)-glycoprotein- 1 autoantibodies from patients with antiphospholipid syndrome are sufficient to potentiate arterial thrombus formation in a mouse model. *Blood*. 2011; 117:3453-3459
41. Prinz N, Clemens N, Strand D, et al. Antiphospholipid antibodies induce translocation of TLR7 and TLR8 to the endosome in human monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2011; 118:2322-2332
42. *Inherited Thrombophilias in pregnancy, the American College of Obstetricians and Gynecologists*. 2001; 124
43. Chang J, Elam-Evans LD, Berg CJ, et al. Pregnancy-related mortality surveillance-United States, 1991-1999. *MMWR Surveill Summ*. 2003; 52:1-8
44. Kupferminc MJ, Yair D, Bornstein NM, et al. Transient focal neurological deficits during pregnancy in carriers of inherited thrombophilia. *Stroke*. 2000; 31:892
45. Robertson L, Wu O, Langhorne P, et al. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol*. 2006; 132:171-196
46. Rodger MA, Betancourt MT, Clark P, et al. The association of factor V leiden and prothrombin gene mutation and placenta-mediated pregnancy complications: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *PLoS Med*. 2010; 7:e1000292
47. Bouvier S, Cochery-Nouvellon E, Lavigne-Lissalde G, et al. Comparative incidence of pregnancy outcomes in thrombophilia-positive women from the NOH-APS observational study. *Blood*. 2014; 123:414
48. Der Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, et al. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost*. 1998; 80:874-877
49. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med*. 1996; 2:386-389
50. Brattstrom L, Wilcken DE, Ohrvik J, et al. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation*. 1998; 98:2520-2526
51. Perla-Kaja J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans. *Amino Acids*. 2007; 32:561-572
52. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17: 99–109 DOI: 10.1111/jth.14343 High levels of coagulation factors and venous thrombosis risk: strongest association for factor VIII and von Willebrand factor I. M. RIETVELD,* † W. M. LIJFERING,*† ‡ S. LE CESSIE, ‡ § M. H. A. BOS,*† F. R. ROSENDAAL, † ‡ P. H. REITSMA*† and S. C. C A N N E GI E T E R† ‡ Received: 30 May 2018 Manuscript handled by: J.-B. Hansen Final decision: J.-B. Hansen, 15 November 2018 © 2018 International Society on Thrombosis and Haemostasis
53. https://www.eae.gr/images/magazine/AIMA_2014-1_xoris-diafim.pdf
Έλεγχος θρομβοφιλίας: σε ποιούς, πότε και γιατί Γρηγόρης Θ.

Γεροτζιάφας,1,2 Ελευθερία Λευκού2. << Έναρξη --> Απόσπασμα
κειμένου --> Αήξη >>

54. *Sulier JP, Larrieu MJ. Nouvelle methode de diagnostic de l' hemophillie. Dosage des facteurs antihemophiliques A et B. Le sang, 1953;24:205-215.*
55. *Zacharski LR, Rosenstein R. Standardization of the one-stage assay for factor VIII (antihemophilic factor). Am J Clin Pathol. 1978; Aug;70 (2)280-6*
56. *Samama M, Conard J, Horellou M.H., Lecompte T., Physiologie et exploration de l' hemostase. Paris : Doin,1990,81-82,116-122.*
57. *Πανελλήνιο Αιματολογικό Συνέδριο Αθήνα 13-15 Νοεμβρίου 2015, Νεώτερα δεδομένα για το αντιφωσfolιπιδικό σύνδρομο. Παθοφυσιολογία του αντιφωσfolιπιδικού συνδρόμου και εργαστηριακές μέθοδοι διερεύνησης. Ελευθερία Λευκού, Αιματολόγος, Διδάκτωρ ΑΠΘ, Εξειδικευθείσα στην Αιμόσταση Θρόμβωση St Thomas Hospital, London U.K.*
58. *Kottke-Marchand K, Dunkan A, Antithrombin deficiency. Issues in laboratory diagnosis. Arch Pathol Lab Med; 2002; 126: 1326-36*
59. *Craig PA, Olson ST, Shore JD: Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III: Chatacterization of assembly, product formation and heparin dissociation in the factor Xa reaction. J Biol Chcm 1989; 264: 5452.*
60. *Brnkhouse KM, Smith HP, et al; The inhibition of blood clotting: An unidentified substance which acts in conjunction with heparin to prevent the conversion or prothrombin to thrombin. Am J Physiol 1939; 125:683*
61. *Rao LVM, Rapaport SI, HoangAD, Binding of factor Vila to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor Vila. Blood 1993;81:2600-7*
62. *Lawson JH, Butenas S, Ribarik N, Mann KG, Complex dependent inhibition of factor Vila by antithrombin and heparin, J Biol Chem 1993;81:704-19*
63. *Γρουζή Ε. Συστάσεις για τον έλεγχο Κληρονομικής Θρομβοφιλίας. Εντατική Θεραπεία & Επείγουσα Ιατρική: Κατευθυντήριες Οδηγίες– 13ο Θεματικό Συνέδριο. Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, ISBN:978-960-489-110-8, Αθήνα Νοέμβριος 2010, σελίδες 1571-1581*
64. *Zhu T. et al. Venous Thromboembolism, Risk Factors for Recurrence. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 2009;29:298-310*
65. *Prandoni P. et al. The risk of recurrent venous thromboembolism after discontinuing anticoagulation in patients with acute proximal deep vein thrombosis or pulmonary embolism. A prospective cohort study in 1,626 patients. Haematologica 2007;92(02):199-205.*